

类黄酮糖基转移酶(UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase, UFGT)

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

花色苷是一类易溶于极性溶剂的天然色素，属黄酮类化合物。花色苷广泛存在于植物的根、茎、叶、花和果实中，使其呈现由红到紫等不同颜色，是植物主要的呈色物质。

类黄酮糖基转移酶（UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase, UFGT）是花色苷合成过程的最后一个酶，可以把不稳定的花色素催化成花色苷，在一定范围内，UFGT活性与花色素的合成呈现正相关。

测定原理：

UFGT 催化 UDPG 与槲皮素生成 UDP；UDP 在丙酮酸激酶与乳酸脱氢酶作用下，氧化 NADH 为 NAD⁺，NAD⁺生成速度与 UDP 含量成正比，通过 340nm 吸光度下降速度反映 UFGT 活性。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存；临用前加入 20mL 试剂四溶解。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 100μL×1 管，4℃避光保存；

试剂四：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

样品测定的准备：

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），冰浴中匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂一	180

混匀，30℃反应 4h，95℃水浴 5min 灭活，冷却至室温。10000g 4℃离心 5min，取反应液待测。

2、工作液配制：在试剂二中加入 20mL 试剂四溶解，再加入 20μL 试剂三，混匀待用。用不完的工作液分装后-20℃保存一个月，禁止反复冻融。

3、在 96 孔板中加入如下试剂

反应液	20
工作液	180

混匀，测定 340nm 下 1min 时吸光值 A1 与 6min 时吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

UFGT 活力计算:

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{UFGT 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10 \\ &= 134 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{UFGT 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 \\ &= 134 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 240 min; 10, 稀释倍数; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量;