

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

试剂盒说明书

(货号: G1009W 微板法 48 样)

一、产品简介:

植物类黄酮糖基转移酶(UFGT)催化类黄酮生物合成的最后一步从而形成多种多样的糖苷衍生物。有研究表明 UFGT 的表达水平与花色苷积累呈现正相关,是花色苷生物合成的关键酶。

类黄酮糖基转移酶(UFGT)催化槲皮素和 UDP-半乳糖生成槲皮素-3-半乳糖苷,通过检测该产物在 350nm 处的增加速率,即可计算得出该酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 1mL 乙醇溶解备用。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂四	粉剂 g×2 瓶	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部,再加 12mL 甲醇溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、无水乙醇、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、类黄酮糖基转移酶(UFGT)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.2g 组织(水分充足的样本可多取如 1g,但纯乙醇需加入 5mL),加入 1mL 经预冷的纯乙醇冰浴匀浆(保证乙醇在整个匀浆液中体积约 85%),低温(可放冰上或 4℃冰箱)放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清,留沉淀,向沉淀中加入经预冷的纯乙醇混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清,留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液,涡旋混匀, 12000rpm, 4℃离心 10min; 上清液置冰上待测。

② 液体样本:

若液体澄清可直接检测;若浑浊则 12000rpm, 4℃离心 10min,取上清置冰上待测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 350nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃)或于 25℃水浴锅中孵育 15-30min 中。

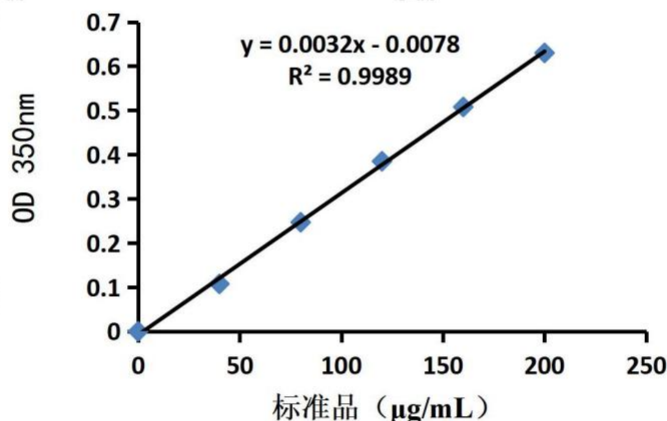
③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	15	15
试剂二	100	100
试剂三	10	
蒸馏水		10
混匀, 30°C 孵育 30min		
试剂四	75	75
混匀, 8000rpm 室温离心, 吸取上清液至 96 孔板中, 于 350nm 处读值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

- 【注】1. 若 ΔA 值在零附近徘徊, 可增加样本加样量 V_1 (如增至 200μL, 则试剂二减少至 0μL), 或增加样本取样质量 W , 则改变后的 V_1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A 测定太大如超过 2, 可用试剂四对 8000rpm 离心后的上清液进行稀释 (如取离心后上清液 100μL 至 96 孔板中, 再加 100μL 的试剂四, 即相当于稀释 2 倍), 则稀释倍数 D 则需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0032x - 0.0078$: x 为标准品即槲皮素-3-半乳糖苷(μg/mL), y 为 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

定义: 每毫克组织蛋白每小时生成 1μg 标准品即槲皮素-3-半乳糖苷定义为一个酶活单位。

$$UFGT(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.0032 \times V_1] \div (V_1 \times Cpr) \div T \times D = 625 \times (\Delta A + 0.0078) \div Cpr \times D$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织每小时生成 1μg 标准品即槲皮素-3-半乳糖苷定义为一个酶活单位。

$$UFGT(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.0032 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 625 \times (\Delta A + 0.0078) \div W \times D$$

4、按液体体积计算:

定义: 每毫升液体每小时生成 1μg 标准品即槲皮素-3-半乳糖苷定义为一个酶活单位。

$$UFGT(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.0032 \times V_1] \div V_1 \div T \times D = 625 \times (\Delta A + 0.0078) \times D$$

V ---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.1mL;

W ---样本质量, g;

T ---反应时间, 30min=0.5h;

D ---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr ---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。