

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

### 试剂盒说明书

（货号：BP10464W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

#### 一、指标介绍：

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，即可计算出该酶活性大小。

#### 二、试剂盒组成和配制：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项                                                                                |
|------|-------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                                     |
| 试剂一  | 粉剂 2 支      | 4℃避光保存   | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加 1mL 乙醇溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 液体 15mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                                     |
| 试剂三  | 粉剂 1 支      | -20℃避光保存 | 1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加 0.6mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 用不完的试剂分装后-20℃保存。   |
| 试剂四  | 粉剂 2 瓶      | 4℃保存     | 每瓶：<br>1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 12mL 甲醇溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。          |

#### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、无水乙醇、甲醇、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

#### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

##### 1、样本提取：

###### 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、检测步骤：

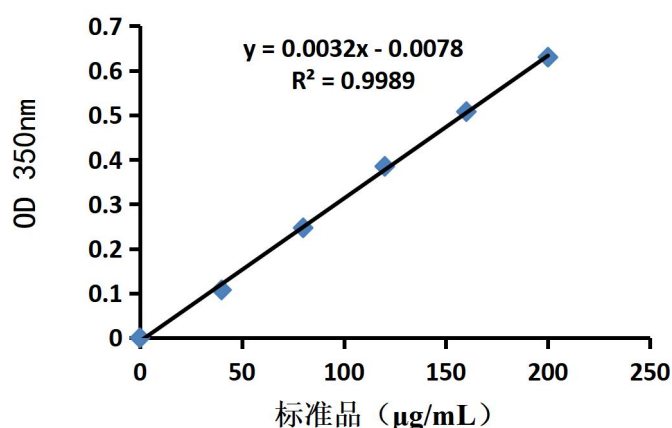
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 350nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于 25℃水浴锅中孵育 15-30min 中。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分 (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℃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  $\Delta A$  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  $\Delta A$ 。



### 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。

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

### 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 1 $\mu$ g 标准品即槲皮素-3-半乳糖苷定义为一个酶活单位。

$$\text{UFGT}(\mu\text{g/h/mL})=[(\Delta A+0.0078)\div 0.0032\times V1]\div V1\div T\times D=625\times(\Delta A+0.0078)\times D$$

V---加入提取液体积， 1 mL；

V1---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。