

类黄酮糖基转移酶 (UFGT) 试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

类黄酮是植物次生代谢产物，糖基化是类黄酮基本结构形成的最主要的修饰反应之一，提高了类黄酮苷元的化学稳定性，这一过程主要由类黄酮糖基转移酶催化的，使类黄酮-OH 与 UDPG 反应，是黄酮合成途径中的关键酶。

测定原理：

类黄酮糖基转移酶催化花青素与尿苷二磷酸葡萄糖反应产生花青苷，主要以矢车菊素 3-葡萄糖苷 (C3G) 形式存在，用 HPLC 检测产物可反映类黄酮糖基转移酶的酶活性。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、离心机、恒温水浴锅、100 目筛、高校液相色谱、针头过滤器（水系、0.22 μm）、滤膜（水系、0.45 μm）、耐水 C18 柱（4.6×250mm）、样品瓶、甲酸、甲醇（色谱级）、超纯水

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加全部试剂三溶解。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 8mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：标准品×1 支，-20℃ 保存。

样本处理：

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：2~5 的比例（建议称取约 0.5g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

实验前的准备工作：

1、检测产物制备

	对照管	测定管
样本 (μL)	100	100
试剂二 (μL)	100	
试剂一 (μL)		150
充分混匀，30℃ 反应 30min		
试剂一 (μL)	150	
试剂二 (μL)		100
充分混匀，10000g，4℃，离心 10min，取上清过 0.45 μm 水系滤头，待检测。		

2、将 500 mL 超纯水和 500 mL 甲醇用 0.45 μm 的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。（注：

蒸馏水用水系滤膜抽滤，甲醇用有机系滤膜抽滤）。

3、流动相的配制：流动相 A 为 1.6%甲酸水溶液；流动相 B 为 1.6%甲酸甲醇溶液。

4、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

5、标准品的配制：

在标准品中加入 1mL 甲醇，配成 5 $\mu\text{mol/mL}$ 母液，将母液用甲醇分别稀释成 2 $\mu\text{mol/mL}$ ，1 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.25 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

测定操作步骤

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 10 μL ，梯度洗脱为 0~5min，85%A+15%B；5~10min，85%A+15%B；10~30min，80%A+20%B；30~30.1min，60%A+40%B；30.1~40min，0%A+100%B。流速 1mL/min，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，走样时间为 50min，检测波长 530nm，设置完毕保存方法组。

2. 初始设置流动相 A=85%，流动相 B=15%，流速 1 mL/min，待基线稳定后开始加样。

3. 加入标准品 10 μL ，在 50min 内可分离 C3G，C3G 的保留时间在 25min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的 C3G 标准品的峰面积。

4. 加入样品 10 μL ，在相应保留时间处检测 C3G 的峰面积。

酶活计算：

1. 以标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）为横坐标，峰面积为纵坐标计算 C3G 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品 C3G 含量。

2. 酶活单位定义：

A. 每毫克组织蛋白每分钟催化反应产生 1 μmol C3G 定义为一个酶活单位。

$$\text{UFGT 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = C \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 0.117 \times C \div C_{\text{pr}}$$

B. 每克组织每分钟催化反应产生 1 μmol C3G 定义为一个酶活单位。

$$\text{UFGT 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = C \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.117 \times C \div W$$

C: C3G 浓度， $\mu\text{mol/mL}$ ；V 反总：反应总体积，0.35mL；V 样：加入样本量，0.1mL，V 样总：加入提取液体积，1mL，C_{pr}：蛋白含量，mg/mL；W：样本质量，g，T：反应时间，min

注意事项：

1、流速由小到大调节，避免柱压过大。

2、使用完毕时，先用 50%的甲醇水溶液洗色谱柱 45min，再用纯甲醇冲洗色谱柱 30min。

3、标准品的稀释倍数要根据样品中 C3G 浓度确定，样品中 C3G 的峰面积必须落在不同浓度的 C3G 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。