

## 类黄酮糖基转移酶 (UFGT) 试剂盒说明书

### HPLC 法 50T/48S

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：

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。

#### 组成：

产品名称	AO023-50T/48S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	4°C避光
试剂二：液体	5ml	4°C
试剂三：液体	8ml	4°C
标准品	1 支	-20°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，4°C避光保存。临用前加全部试剂三溶解。

#### 自备仪器和用品：

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、0.22μm）、滤膜（水系、0.45μm）、耐水 C18 柱（4.6×250mm）、样品瓶、甲酸、甲醇（色谱级）、超纯水

#### 酶液提取：

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°C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
--	-----	-----

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



样本 (μl)	100	100
试剂二 (μl)	100	
试剂一 (μl)		150
充分混匀, 30°C反应 30min		
试剂一 (μl)	150	
试剂二 (μl)		100
充分混匀, 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清过 0.45μm 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 5μmol/ml 母液, 将母液用甲醇分别稀释成 2μmol/ml, 1μmol/ml、0.5μmol/ml、0.25μmol/ml、0.125μmol/ml 的标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

### 测定操作表:

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°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 (μmol/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 1μmol C3G 定义为一个酶活单位。

UFGT 活性 (μmol/min/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 1μmol C3G 定义为一个酶活单位。

UFGT 活性 (μmol/min/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, μmol/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, Cpr: 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。

