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

试剂盒说明书

（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。

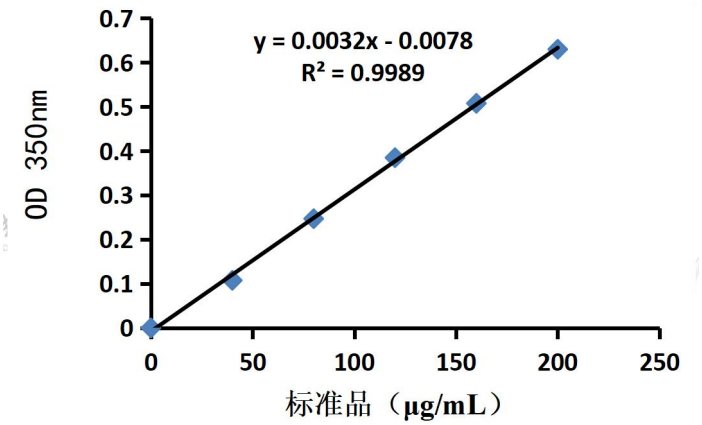
② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于 25℃水浴锅中孵育 15-30min 中。

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℃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，ΔA=A 测定-A 对照(每个样本做一个自身对照)。		

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(μg/h/mg prot)=[(ΔA+0.0078)÷0.0032×V1]÷(V1×Cpr)÷T×D=625×(ΔA+0.0078)÷Cpr×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(μg/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0078)÷0.0032×V1]÷(W×V1÷V)÷T×D=625×(ΔA+0.0078)÷W×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(μg/h/mL)=[(ΔA+0.0078)÷0.0032×V1]÷V1÷T×D=625×(ΔA+0.0078)×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。