



类黄酮糖基转移酶检测试剂盒

UFGT Assay Kit

HPLC 法

产品编号: AK367H

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES367	50mL×1瓶	4℃保存;
AK367-A	粉剂×1瓶	4℃避光保存。临用前加全部 AK367-C 溶解。
AK367-B	5mL×1瓶	4℃保存;
AK367-C	8mL×1瓶	4℃保存;
AK367-D	标准品×1支	-20℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 花色苷是一类易溶于极性溶剂的天然色素, 属黄酮类化合物。花色苷广泛存在于植物的根、茎、叶、花和果实中, 使其呈现由红到紫等不同颜色, 是植物主要的呈色物质。类黄酮糖基转移酶 (UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase, UFGT) 是花色苷合成过程的最后一个酶, 可以把不稳定的花色素催化成花色苷, 在一定范围内, UFGT 活性与花色素苷的合成呈现正相关。

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、0.22 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。

酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): ES367 体积 (mL) 为 1: 2~5 的比例 (建议称取约 0.5g 组织, 加入 1mL ES367), 进行冰浴匀浆。10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 液体: 直接检测。

实验前的准备工作:

1. 检测产物制备

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
样本	100	100
AK367-B	100	
AK367-A		150
充分混匀, 30℃反应 30min		
AK367-A	150	
AK367-B		100
充分混匀, 10000g, 4℃, 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 5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 母液，将母液用甲醇分别稀释成 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ，1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 、0.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 、0.125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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（ $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）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。

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

注：C：C3G 浓度， $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；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（ES367）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。