Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

类黄酮糖基转移酶（UFGT）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5665

规格：100T/96S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 1 mL×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 80 μL×1 支	2-8℃保存
试剂五	液体 35 μL×1 支	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂七	粉剂×1 瓶	-20℃保存

溶液的配制：

1、 提取液：临用前将粉剂一倒入提取液中，此溶液为悬浊液，使用前摇匀即可；

2、 试剂二工作液：：临用前根据样本数量按照试剂一：试剂二=171μL: 9μL（180μL，2T）的比例配制，充分混匀，现配现用；

3、 试剂三 ：临用前加入 10 mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂分装保存，-20℃保存可以保存 4 周，避免反复冻融；

4、 试剂六：试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前加入 6 mL 蒸馏水，充分混匀，未用完的试剂分装保存，-20℃保存可以保存 4 周，避免反复冻融；

5、 试剂七：试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前加入 6 mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂分装保存，-20℃保存可以保存 4 周，避免反复冻融；

6、 工作液：临用前根据样本数量按照试剂一：试剂四：试剂五：试剂六：试剂七=1.4mL：5**μL**：2**μL**：0.3 mL：0.3 mL（2007μL，约 7T）的比例配制，充分混匀，现配现用。（试剂四、试剂五使用需先将液体离心至底部使用）

产品说明：

类黄酮糖基转移酶（UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase, UFGT）是莽草酸途径的最后一个作用酶，也是使花色素形成稳定的花色苷的第一个作用酶，并使其由无色转为有色；UFGT 是果实着色过程中的关键酶，它使不稳定的花色素转变为稳定的花色苷。

UFGT 催化 UDPG 与槲皮素生成 UDP 和槲皮素糖苷；UDP 在丙酮酸激酶与乳酸脱氢酶作用下，氧化 NADH 为 NAD^+，NAD^+生成速度与 UDP 含量成正比，通过 340nm 吸光度下降速度反映 UFGT 活性。

$$UDPG + Quercetin \xrightarrow{UFGT} [Quercetin]_n + UDP$$

$$UDP + PEP \xrightarrow{PK} UTP + Pyruvate$$

$$\text{Pyruvate + NADH (340nm) + H}^{+} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{NAD}^{+} + \text{Lactic Acid}$$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、蒸馏水和冰。

操作步骤：

一、 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、 组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 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。

二、测定步骤

1、 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，紫外分光光度计用蒸馏水调零。

2、加样表：首先在 1.5mLEP 管中按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂二工作液	90	90
试剂三	90	90
混匀，30℃反应 4h，95℃水浴 10 min 灭活，冷却至室温。10000g 4℃离心 5min，取**上清液**待测。（在此期间将工作液 37℃预热 5min）		
上清液	30	30
工作液	270	270
将上清液和工作液分别加入微量石英比色皿中或 96 孔 UV 板中，立即充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃水浴或恒温培养箱 2min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃），拿出迅速擦干测定 2min10s 时的吸光值 A2。记录 340nm 下 10s 时吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2。计算 A 测定=A1 测定-A2 测定，A 空白=A1 空白-A2 空白，ΔA =A 测定-A 空白。空白管只需做 1-2 次。		

三、类黄酮糖基转移酶（UFGT）活力计算

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每小时催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

UFGT 活力(U/mg prot) = ΔA×V **反总 II**÷（ε×d）×10^9÷ （Cpr ×V 样÷V **反总 I**×V 上清）÷T×F

= 4019.29×ΔA ÷Cpr×F

2、按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织每小时催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

UFGT 活力(U/g 质量) = ΔA×V **反总 II**÷（ε×d）×10^9÷（W× V 样÷V 样总÷V **反总 I**×V 上清）÷T×F

= 4019.29×ΔA÷W×F

V **反总 I**：30℃第一步反应体系总体积（V 样+V 试剂二工作液+V 试剂三），0.2mL；V **反总 II**：37℃第二步反应体系总体积，0.3×10^{-3}L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：石英比色皿或 96 孔板光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.02mL；V 上清：第二步反应中上清液体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，4h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；F：稀释倍数；10^9：换算系数，1mol=10^9nmol。

注意事项：

1、 如果 A1 测定＜A1 空白或者 ΔA 大于 0.5，，可以对上清液进行稀释或者缩短 30℃反应时间重新测定；ΔA＜0.005，可以加大样本量或者延长 30℃反应时间重新测定。最终计算时同步修改计算公式。

实验实例：

1、 称取 0.1078g 洋桔梗，加入提取液进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 A 测定=A1 测定-A2 测定=0.9988-0.9807=0.0181，A 空白=A1 空白-A2 空白=0.8157-0.8121=0.0036，ΔA =A 测定-A 空白=0.0145。带入公式计算：

UFGT 活力(U/g 质量)= 4019.29×ΔA÷W= 540.63 U/g 质量

2、 称取 0.1133g 洋葱，加入提取液进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 A 测定=A1 测定-A2 测定=0.8309-0.8157=0.0152，A 空白=A1 空白-A2 空白=0.8157-0.8121=0.0036，ΔA =A 测定-A 空白=0.0116。带入公式计算：

UFGT活力(U/g 质量)= 4019.29×ΔA÷W=411.51 U/g 质量

参考文献：

[1] Parvaneh, TaherehAbedi, BahramDavarynejad, Gholam HosseinMoghadam, Ebrahim Ganji. Enzyme activity, phenolic and flavonoid compounds in leaves of Iranian red flesh apple cultivars grown on different rootstocks[J]. Scientia horticulturae, 2019, 246.

[2] Mori K, Sugaya S, Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition[J]. Hort, 2005, 105(3):319-330.

相关系列产品：

BC1350/BC1355 植物原花青素（OPC）含量检测试剂盒

BC4090/BC4095 花青素还原酶（ANR）活性检测试剂盒

BC1380/BC1385 植物花色苷含量检测试剂盒