

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDPGT)(PNP 法)活性测定说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介：

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (glucuronosyltransferase, UDPGT/UGT, EC 2.4.1.17) 是一种结合在内质网上的膜蛋白,该酶催化葡萄糖醛酸基团从供体尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 (Uridine 5-Diphosphoglucuronic Acid, UDPGA) 转移至受体上,受体包括酚类、醇类、胺类和脂肪酸类。葡萄糖醛酸化代谢促进了药物和其他外源物质通过肾脏或胆汁的排泄,在生物体内代谢、解毒、清除过程中发挥重要作用。

UDPGT 催化供体尿苷二磷酸葡萄糖醛酸的葡萄糖醛酸基团转移至对硝基苯酚 (PNP),后者在 405nm 处有特征吸收峰,通过测定吸光值降低速率可计算 UDPGT 活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加入 1.2mL 乙醇(自备)混匀溶解,再用乙醇稀释 20 倍后备用。
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加入 1.2mL 蒸馏水混匀溶解备用。
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温培养箱、可调式移液器、低温离心机、研钵、蒸馏水和乙醇。

四、UDPGT 活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

1、待检液制备：

组织样本：取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g),加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,4℃×3000rpm 离心 10min 后,弃沉淀留上清;上清液转移至新 EP 管中,继续于 4℃×9000rpm 离心 10min,弃沉淀留上清;上清液转移至新 EP 管中,于 4℃×12000rpm 离心 20min,弃上清留沉淀,沉淀中加入 0.5mL 提取液重悬,置于冰上作为待检测样本。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 405nm,调节恒温培养箱至 37℃。

② 试剂解冻至室温(37℃),或可放在 37℃条件下水浴 5-15min。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂(μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	110	120
试剂二	30	30
试剂三	10	
混匀,37℃孵育 30min		
试剂四	100	100

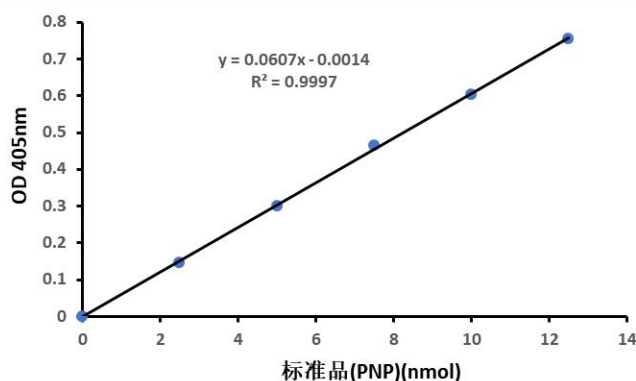
混匀，于 4℃或室温，8000rpm，离心 10min，取 200μL 上清液至 96 孔板中，于 405nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。

【注】：1.若 ΔA 值低于 0.01，则可增加样本取样质量 W 或增加样本量 V_1 ，则改变后的 W 和 V_1 需代入公式重新计算。

2.如果 ΔA 大于 0.6，需要将待检液用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数 D 。

五、结果计算：

1、标准方程为 $y = 0.0607x - 0.0014$ ； x 为标准品摩尔质量（nmol）， y 为吸光值 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每小时分解 1nmol 的对硝基苯酚（PNP）的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{UDPGT}(\text{nmol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0607] \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \times D \\ &= 658.98 \times (\Delta A + 0.0014) \div C_{\text{pr}} \times D\end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

酶活定义：每克组织每小时分解 1nmol 的对硝基苯酚（PNP）的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{UDPGT}(\text{nmol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0607] \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D \\ &= 329.5 \times (\Delta A + 0.0014) \div W \times D\end{aligned}$$

V ---样品提取液总体积，0.5mL；

V_1 ---测定时待检液体积，0.05mL；

W ---样本质量，g；

T ---反应时间，30 min=0.5h；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10nmol/μL）：用前甩几下试剂，使粉体落入底部，再向标准品 EP 管里面加 1.4mL 乙醇溶解。
- 2 把母液用乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25..nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 50μL 标准品+150μL 试剂一+100μL 试剂四，混匀，取 200μL 上清液至 96 孔板中，于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。