

肉桂酸-4-羟化酶（C4H）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10634

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 2 mL 乙醇溶解备用。
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 2 mL 双蒸水充分溶解待用。现配现用。

产品说明：

C4H又称反式肉桂酸-4-单氧化酶，是催化桂皮酸形成咖啡豆、香豆酸的酶。C4H多存在于高等植物、酵母、菌类中，属于细胞木质素合成途径中间的关键酶。

C4H催化肉桂酸和NADPH生成4-香豆酸盐和NADP，在340nm下测定NADPH的减少速率，即可反映C4H活性。

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、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器、乙醇、冰和蒸馏水。

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 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12000g 4℃离心 15 分钟，取上清，置冰上待测。
- 2、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。12000g，4℃离心 15min，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，波长调至340nm，蒸馏水调零。
- 2、加样表（微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入）

试剂名称（ μL ）	测定管
试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
样本	20

充分混匀后立即测定 10s 时在 340nm 下的吸光度, 记为 A1, 之后迅速将其放入 37°C 水浴或 37°C 培养箱中 3min (若酶标仪带有控温功能, 将温度调为 37°C)。然后迅速拿出擦净后测定 190s 时的吸光度, 记为 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、C4H 酶活计算

A、按微量石英比色皿计算:

1、按蛋白浓度计算:

单位的定义: 每mg组织蛋白在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算:

单位的定义: 每g组织在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞或细菌个数计算:

单位的定义: 每 10^4 个细胞或细菌在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

V反总: 反应总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH的摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入的样本体积, 0.02mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V提取: 提取液体积, 1mL; 500: 500万个细胞; T: 反应时间, 3min; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

B、按96孔UV板计算:

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm (96孔板光径) 进行计算即可。

注意事项:

当 ΔA 大于0.4时, 建议将样本用提取液稀释后测量; ΔA 过小时, 建议增加酶促反应时间 (5min或10min) 或增加加入的样本体积来测定。

实验实例:

1. 取 0.1g 黄豆 (发芽) 加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 使用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 1.1227 - 0.9854 = 0.1373$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{C4H 酶活 (U/g 质量)} = 535.91 \times \Delta A \div W = 535.91 \times 0.1373 \div 0.1 = 735.80 \text{ U/g 质量}。$$