

肉桂酸 4-羟基化酶 (C4H) 试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

肉桂酸-4-羟基化酶 (C4H, EC 1.14.13.11) 是苯丙烷类代谢途径的关键酶。可有效调节与之相应的黄酮类化合物等次生代谢产物的合成,其活性可作为植物抗性的一个生理指标。

本产品测试原理是以肉桂酸作为底物,在酶促反应的最适条件下,肉桂酸-4-羟基化酶催化底物生成 4-羟基反式肉桂酸,其在最佳 PH 值下,产物 4-羟基反式肉桂酸在 340nm 下有最大吸收峰,进而计算出该酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	试剂规格	保存方式	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 2.5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	-20°C保存	使用前甩几下使粉剂落入底部,每瓶再加 10mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融,一周内用完。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 2.5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 3mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需用的仪器与用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、肉桂酸 4-羟基化酶 (C4H) 活性检测:

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:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g),加入 1mL 提取液组织,进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量 (g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	100	
试剂一	50	50
试剂二	350	350
试剂三	300	400
混匀, 30°C 水浴反应 30min		
试剂四	50	50
混匀, 静置 2min		
试剂五	60	60

混匀后，取全部液体转移至 1mL 石英比色皿中，于 340nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 空白。

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可增加样本加样量（如增加至 200 μ L，则试剂三相应减少）或增加反应时间 T，则改变后的加样体积 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1. 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1nmol 的 4-羟基反式肉桂酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C4H (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9)] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 12.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 的 4-羟基反式肉桂酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C4H (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9)] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 12.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

ϵ ---4-羟基反式肉桂酸在此反应条件下于 340nm 处的摩尔吸光系数， 2.45×10^4 L/mol /cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.1 mL；

V2 ---反应体系总体积，910 μ L= 9.1×10^{-4} L；

d --光径，1 cm；

T---反应时间，30 min；

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。