

肉桂酸 4-羟基化酶（C4H）试剂盒说明书

（货号：BP10110W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 20mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，一周内用完。
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 7mL×1 瓶	4℃ 保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

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℃水浴反应 30min		
试剂四	50	50
混匀，静置 2min		
试剂五	60	60

混匀后，取 200 μ L 转移至 96 孔板，在 340nm 下读取吸光值 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。

$$C4H(nmol/min/g \text{ 鲜重})=[(\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9)] \div (W \times V1 \div V) \div T = 24.8 \times \Delta A \div W$$

2. 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。

$$C4H(nmol/min/mg \text{ prot})=[(\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9)] \div (V1 \times Cpr) \div T = 24.8 \times \Delta A \div Cpr$$

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 --96 孔板光径，0.5 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。