

4-香豆酸:辅酶 A 连接酶(4-coumarate:CoA ligase, 4CL)试剂盒说明书

(货号: BP10457F-48 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

4-香豆酸:辅酶 A 连接酶 (4CL, EC 6.2.1.12) 是木质素生物合成的关键酶之一, 位于苯丙酸途径与木质素特异合成途径的转折点上, 主要催化肉桂酸生成相应的肉桂酸辅酶 A 酯。该酶主要存在于高等植物、酵母和菌类中, 研究该酶可以探讨多种生物细胞发育过程中木质素沉积的代谢机理, 为减少水果石细胞含量而提高其品质提供依据。

4CL 催化 4-香豆酸和 CoA 生成 4-香豆酸 CoA, 在 333nm 下测 4-香豆酸 CoA 生成速率, 即可反映 4CL 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加 5mL 蒸馏水, 于 80-100°C水浴 1-2 分钟溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 1 瓶	-20°C避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加 4.1mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

① 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°C×12000rpm 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 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照数量(10^4): 提取液体积(mL)为 500-1000: 1 的比例进行提取

③ 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、检测步骤:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 333nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂至常温状态。在 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	560

试剂二	80
试剂三	80
混匀，室温（25℃）下立即于 333nm 处读取吸光值 A1，30min 后再读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可加大样本量（如增至 160 μ L，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T，则改变后的样本体积 V1 和 T 需代入公式重新计算。
2. 若上升趋势不稳定，可每隔 2min 读取一次吸光值，选取一段线性上升时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟使吸光值变化 0.005 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$4CL(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.005 \div T = 83.3 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟使吸光值变化 0.005 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$4CL(U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.005 \div T = 83.3 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟使吸光值变化 0.005 所需酶量定义为一个酶活单位。

$$4CL(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.005 \div T = 0.17 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟使吸光值变化 0.005 所需的酶量定义为一个酶活单位。

$$4CL(U/mL) = \Delta A \div V1 \div 0.005 \div T = 83.3 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.08 mL；

T---反应时间，30min； W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 万。

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。