

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

(货号: BP10457W 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加 2.5mL 蒸馏水, 于 80-100℃ 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℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 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)、96 孔板 (UV 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:

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℃×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℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照数量 (10⁴): 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℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 333nm。
- ② 所有试剂至常温（25℃）状态。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
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 40μL，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T，则改变后的 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 0.01 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$4CL(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.01 \div T = 166.7 \times \Delta A \div Cpr$$

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 0.01 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$4CL(U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 166.7 \times \Delta A \div W$$

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 0.01 所需酶量定义为一个酶活单位。

$$4CL(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 0.333 \times \Delta A$$

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 0.01 所需的酶量定义为一个酶活单位。

$$4CL(U/mL) = \Delta A \div V1 \div 0.01 \div T = 166.7 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.02 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。