

## 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸微板法)

### 产品简介

4-香豆酸辅酶A连接酶是催化桂皮酸形成咖啡酸、香豆酸的酶，该酶多存在于高等植物、酵母、菌类可溶性部分物质，属于细胞木质素合成途径中间的关键酶，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提高其品质提供依据。

4-香豆酸辅酶A连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸微板法)检测原理是以香豆酸作为底物，在酶促反应的最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法，于酶标仪333nm处测定吸光度，以吸光度变化所需酶量进行计算，主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的4-香豆酸辅酶A连接酶活性，尤其适用于测定水果中4-香豆酸辅酶A连接酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成

名称 \ 编号	ADS045TE0 60T	Storage
试剂(A): 4CL Lysis Buffer	125ml	4°C 避光
试剂(B): 4CL Assay Buffer	1.5ml	4°C 避光
试剂(C): CoA-SH Solution	10ml	-20°C
试剂(D): 4CL 终止液(备选)	1ml	RT
试剂(E): 4CL 对照	1.5ml	RT
使用说明书	1 份	

### 自备材料

- 1、蒸馏水
- 2、研钵或匀浆器、离心管或试管、冷冻离心机、水浴锅或恒温箱、96孔板、酶标仪

### 操作步骤(仅供参考)

- 1、准备样品:

①植物样品：取0.5g植物组织或水果中层果肉，冰浴情况下充分捣碎研磨或匀浆，加入2ml 4CL Lysis Buffer继续研磨或匀浆，10000g4℃离心15~20min，留取上清液，-20℃冻存，用于4-香豆酸辅酶A连接酶的检测。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，-20℃冻存，用于4-香豆酸辅酶A连接酶的检测。

③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如果有必要需进行适当匀浆，10000g4℃离心15~20min，取上清液，-20℃冻存，用于4-香豆酸辅酶A连接酶的检测。

④高活性样品：如果样品中含有较高活性的4-香豆酸辅酶A连接酶，可以使用蒸馏水或4CL Lysis Buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、4CL加样：按照下表设置对照孔、测定孔，取出CoA-SH Solution 等试剂恢复至室温溶解，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的4CL活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，如样品的较多样品可以设置2平行孔，求平均值以使结果更可靠。

加入物(μl)	对照孔	测定孔
4CL 对照	17.5	—
待测样品	35	35
4CL Assay Buffer	—	17.5
CoA-SH Solution	157.5	157.5

3、4CL测定：立即用酶标仪，以对照孔为对照，测定333nm处测定孔的吸光度(测定孔与对照孔的差值即为 $A_{\text{测定}0}$ )，40℃准确孵育待测样品5min后，立即加入0.05ml4CL终止液终止反应(备选方案)，用酶标仪以对照孔为对照，测定333nm处测定孔的吸光度(测定孔与对照孔的差值即为 $A_{\text{测定}1}$ )。注意：加入4CL终止液终止反应不是必须步骤，可40℃准确孵育5min后直接以酶标仪，以对照孔为对照，测定333nm处测定孔的吸光度( $A_{\text{测定}1}$ )。

## 计算

4CL 活性单位的定义：在该实验条件下，每1min吸光度变化0.01所需酶量为一个活性单位。

$$\text{组织样本 } 4\text{CL(U)} = \{(A_{\text{测定}1} - A_{\text{测定}0}) \times V_T\} / (W \times V_S \times 0.01 \times t)$$

$$\text{液体样本 } 4\text{CL(U)} = (A_{\text{测定}1} - A_{\text{测定}0}) / (0.01 \times t)$$

式中： $A_{\text{测定}1}$  = 孵育5min后测定孔的吸光度

$A_{\text{测定}0}$  = 加入CoA-SH Solution后立即测定的测定孔吸光度

$V_T$  = 提取酶液的总体积(ml)

$W$  = 组织样本的重量(g)

$V_s$  = 测定时所用酶液体积(ml)

$t$  = 反应时间

### 注意事项

- 1、CoA-SH Solution 需避免反复冻融，以免检测效率下降，可分装成小份保存。
- 2、4CL 酶液提取时，注意低温操作，防止酶活性，亦可  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。
- 3、4CL 终止液具有一定腐蚀性，请小心操作。
- 4、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期:** 6个月。低温运输，按要求保存。