

肉桂酸 4-羟基化酶 (C4H) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-QT020 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	-20°C保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 每瓶再加 20mL 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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需用的仪器与用品:

酶标仪、96 孔板、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 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°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 200μL 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 μL ，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。

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

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。

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

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， $2.45 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

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 μL = $9.1 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。