



肉桂酸-4-羟化酶（C4H）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：BC4080

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 3 mL 乙醇溶解备用。2-8℃保存 4 周。
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 3 mL 双蒸水充分溶解待用。现配现用。-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

C4H又称反式肉桂酸-4-单氧化酶，是催化桂皮酸形成咖啡豆、香豆酸的酶。C4H多存在于高等植物、酵母、菌类中，属于细胞木质素合成途径中间的关键酶。

C4H催化肉桂酸和NADPH生成4-香豆酸盐和NADP，在340nm下测定NADPH的减少速率，即可反映C4H活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12000g，4℃离心 15 分钟，取上清，置冰上待测。

2、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。12000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计预热30min，波长调至340nm，蒸馏水调零。

2、加样表（在1mL石英比色皿中分别加入）

试剂名称（ μL ）	测定管
-----------------------	-----

试剂一	700
试剂二	100
试剂三	100
样本	100

充分混匀后立即测定 10s 时在 340nm 下的吸光度, 记为 A1, 之后迅速将其放入 37°C 水浴或 37°C 培养箱中 3min。然后迅速拿出擦净后测定 190s 时的吸光度, 记为 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、C4H 酶活计算

1、按蛋白浓度计算:

单位的定义: 每mg组织蛋白在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算:

单位的定义: 每g组织在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞或细菌个数计算:

单位的定义: 每 10^4 个细胞或细菌在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

V反总: 反应总体积, 0.001L; ϵ : NADPH的摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入的样本体积, 0.1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V提取: 提取液体积, 1mL; 500: 500万个细胞; T: 反应时间, 3min; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

注意事项:

当 ΔA 大于0.4时, 建议将样本用提取液稀释后测量; ΔA 过小时, 建议增加酶促反应时间(5min或10min)或增加加入的样本体积来测定。

实验实例:

1. 取 0.1g 黄豆(发芽)加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 1.643 - 1.510 = 0.133$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{C4H酶活 (U/g 质量)} = 535.91 \times \Delta A \div W = 535.91 \times 0.133 \div 0.1 = 712.76 \text{ U/g 质量}$$

相关系列产品:

BC1360/BC1365 尿酸(UA)含量检测试剂盒

BC1340/BC1345 植物总酚(TP)含量检测试剂盒

BC1330/BC1335 植物类黄酮含量检测试剂盒