

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

(货号: G1003W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 14mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 支	4°C 保存	用前甩几下使试剂落入底部,再加 2.5mL 蒸馏水,于 80-100°C 水浴 1-2 分钟溶解备用。
试剂三	粉剂×1 支	-20°C 保存	用前甩几下使试剂落入底部,再加 2.1mL 蒸馏水充分溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板(UV 板)、低温台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、4-香豆酸:辅酶 A 连接酶(4CL)活性测定:

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:

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(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°C×12000rpm,离心 10min,取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 333nm。

② 所有试剂至常温(25°C)状态。在 96 孔板中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	20
试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
混匀,室温(25°C)下立即于 333nm 处读取吸光值 A1,30min 后再读取 A2,ΔA=A2-A1。	

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。