

4-香豆酸：辅酶A连接酶（4CL）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1006

产品规格：100管/96样

产品简介

4-香豆酸：辅酶A连接酶（4-coumarate:CoA ligase, 4CL）是木质素生物合成的关键酶之一，主要催化肉桂酸及其羟基或者甲氧基衍生物生成相应的辅酶A酯，这些中间产物随后进入苯丙类衍生物支路合成途径。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，其在333nm下测有特征吸收峰，测定4-香豆酸CoA的生成速率，即可反应4CL活性。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×2瓶	4℃
试剂一	液体15mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体3mL×1瓶	4℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	粉剂×1支	4℃

溶液的配制：

1. 提取液：内含不溶物，使用前摇匀；
2. 试剂二：临用前加入3mL蒸馏水溶解，可以分装后-20℃保存，避免反复冻融；
3. 试剂四：临用前用4mL蒸馏水溶解备用，可以分装后-20℃保存，避免反复冻融；
4. 试剂五：加入1mL蒸馏水溶解，临用前用蒸馏水稀释40倍后备用，现用现配；
5. 工作液的配制：按体积比将试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=1:1:1:1的比例配制工作液，现用现配。

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、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤（仅供参考）：

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. 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；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议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）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至333nm，蒸馏水调零。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

2. 操作表（在0.5mL EP管中进行下列操作）：

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
工作液	80	80
试剂一	100	100

充分混匀后测定333nm下的初始值A1，37℃反应30min后再次测定吸光值A2，计算 ΔA 测定管=A2测定管-A1测定管， ΔA 空白管= A2空白管-A1空白管， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。

三、4CL活计算

A、按微量石英比色皿计算：

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每mg组织蛋白每分钟生成1nmol 4-香豆酸辅酶A定义为一个酶活力单位。

$$4\text{CL (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 15.87 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算：

单位定义：每g组织每分钟生成1nmol 4-香豆酸辅酶A定义为一个酶活力单位。

$$4\text{CL (U/g质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 15.87 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算：

单位定义：每1万个细菌或细胞每分钟生成1nmol 4-香豆酸辅酶A定义为一个酶活力单位。

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

$$= 0.03174 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：4-香豆酸辅酶A摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，30min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万； 10^9 ：单位换算系数，1mol= 10^9 nmol。

B、按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔UV板光径）进行计算即可。

注意事项：

1. 若 ΔA 大于0.5，将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。
2. 建议一次测定不要测定过多样本以免耽误过多的酶促反应时间。
3. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.01。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com