

## 肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1861

产品规格: 100管/96样

### 产品简介:

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。**

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×2瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二:临用前加入2mL乙醇溶解备用。2-8℃保存4周。
2. 试剂三:临用前每瓶加入2mL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。

### 需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、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/酶标仪预热30min,波长调至340nm,蒸馏水调零。
2. 加样表(微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入):

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
样本	20

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℃水浴或37℃培养箱中3min(若酶标仪带有控温功能,将温度调为37℃)。然后迅速拿出擦净后测定190s时的吸光度,记为A2。计算 $\Delta A=A1-A2$ 。



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

### 三、C4H 酶活计算

#### A、按微量石英比色皿计算：

##### 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。

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

##### 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， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADPH 的摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V

样：加入的样本体积，0.02mL；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， $1\text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

#### B、按 96 孔 UV 板计算：

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

#### 注意事项：

当  $\Delta A$  大于 0.4 时，建议将样本用提取液稀释后测量； $\Delta A$  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，使用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A = A_1 - A_2 = 1.1227 - 0.9854 = 0.1373$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{C4H 酶活 (U/g 质量)} = 535.91 \times \Delta A \div W = 535.91 \times 0.1373 \div 0.1 = 735.80 \text{ U/g 质量。}$$



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

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com