

肉桂酸-4-羟化酶(Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)试剂盒

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

C4H 又称反式肉桂酸-4-单氧化酶，多存在于高等植物、酵母、菌类中，该酶催化肉桂酸羟化作用产生 4-香豆酸盐，是苯丙烷途径中继 L-苯丙氨酸解氨酶之后的第二个关键酶。

测定原理：

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

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 25 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃保存；

粗酶液提取：

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（10⁴ 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。

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。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 取试剂二一瓶，加入 10mL 试剂一充分溶解混匀，置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min；现配现用 (配好后 24h 内用完)；

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本和 190 μL 试剂二，混匀，立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

C4H 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。C4H (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$ (2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

C4H (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。C4H (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，2 × 10⁻⁴ L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22 × 10³ L / mol / cm；d：

比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 min; 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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。 $C4H (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 1286 \times \Delta A \div Cpr$ (2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$C4H (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。 $C4H (\text{nmol/min/104 cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d:

96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 min; 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。

