



4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）活性检测试剂盒  
4-Coumarate: Coenzyme A Ligase (4CL) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）活性检测试剂盒

### 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase (4CL) Activity Assay Kit

#### 一、产品描述

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）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，能够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，产物随后进入苯丙类衍生物支路合成途径，4-香豆酸：辅酶 A 连接酶活性测定对多种生物细胞发育过程中木质素沉积代谢机理研究具有重要意义。

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶能够催化 4-香豆酸和 CoA 生成 4-香豆酸 CoA，产物在 333 nm 处具有特征吸收峰，通过测定 4-香豆酸 CoA 生成速率即可表征 4-香豆酸：辅酶 A 连接酶的活性。

#### 二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	内含不溶物，混匀后使用
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 保存，避免反复冻融)
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 保存，避免反复冻融)
试剂五	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1 mL 无水乙醇充分溶解 (蒸馏水稀释 40 倍后使用，现用现配)
工作液的配制（现用现配）：根据使用量按试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=1:1:1:1 的体积比配制即为工作液。			

#### 三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

## 1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按细菌或细胞数量（ $10^4$ 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1 mL提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率20%或200 W，超声3 s，间隔10 s，重复30次），4°C 8000 g离心10 min，取上清置于冰上待测。

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0.1 g组织，加入1 mL提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g离心10 min，取上清置于冰上待测。

## 2.测定步骤

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

②在96孔UV板或离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 ( $\mu\text{L}$ )	空白组 ( $\mu\text{L}$ )
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20
工作液	80	80
试剂一	100	100

**吸光值测定：**①充分混匀并立即开始计时，测定333 nm处初始吸光值，记为A1测定和A1空白；②37°C反应30 min后测定333 nm处吸光值，记为A2测定和A2空白；③计算 $\Delta A$ 测定=A2测定-A1测定， $\Delta A$ 空白=A2空白-A1空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- $\Delta A$ 空白。注：空白组只需测定1-2次。

## 3.4-香豆酸：辅酶A连接酶（4CL）活性计算

### 3.1 使用微量石英比色皿的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$4CL \text{ (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{15.87 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$4CL \text{ (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{15.87 \times \Delta A}{W}$$

### ③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每  $10^4$  个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL \text{ (U/}10^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{15.87 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

**注释：** V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1 cm；T：反应时间，30 min；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量，以万计； $10^9$ ：单位换算系数，1 mol= $10^9$  nmol。

### 3.2 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

将上述公式中的微量石英比色皿光径 d-1 cm 改为 96 孔 UV 板光径 d-0.5cm 进行计算即可。

## 四、注意事项

- ①若  $\Delta A$  大于 0.5，建议将粗酶液使用蒸馏水适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②空白组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；
- ③准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板应使用多道移液器分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

**boxbio**

**Manufactured and Distributed by**

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.  
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

