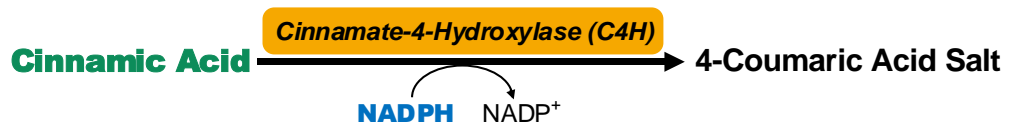




肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性检测试剂盒
Cinnamate-4-Hydroxylase (C4H) Activity Assay Kit



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



肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性检测试剂盒

Cinnamate-4-Hydroxylase (C4H) Activity Assay Kit

一、产品描述

肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamate 4-Hydroxylase, C4H) 是苯丙烷代谢途径中的关键酶之一, 属于细胞色素 P450 单加氧酶超家族的成员, 主要催化反式肉桂酸在苯环的 4 位上进行羟基化反应生成 4-香豆酸, 在木质素、黄酮类和芳香类等次级代谢产物的生物合成过程中发挥重要作用。

肉桂酸-4-羟化酶能够催化肉桂酸和 NADPH 生成 4-香豆酸盐和 NADP⁺, NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化速率即可表征肉桂酸-4-羟化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 2 mL 无水乙醇充分溶解 (配制后 4°C 可保存 1 个月, 注意密封保存)
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 2 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 个月, 避免反复冻融)

需自备试剂: 无水乙醇 (C₂H₆O, MW=46.07, CAS:64-17-5)

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、恒温培养箱、无水乙醇和蒸馏水。

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 12000 g 离心 10 min, 取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 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 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 200W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清液置于冰上待测。

③培养液等液体样本: 直接检测或适当稀释后再进行检测, 若样本浑浊需离心后取上清测定。

2. 测定步骤

- ① 紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ② 试验前将试剂一置于 37°C 预热 10 min 以上；
- ③ 在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)
试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
粗酶液	20

- 吸光值测定：**① 充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1；
② 37°C 准确反应 180 s，测定 190 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A2；③ 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3. 肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

① 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{1071.81 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

② 按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{1071.81 \times \Delta A}{W}$$

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消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{1071.81 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④ 按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 1071.81 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$C4H \text{ (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{535.91 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$C4H \text{ (U/mg)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{535.91 \times \Delta A}{W}$$

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消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$C4H \text{ (U}/10^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{535.91 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$C4H \text{ (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 535.91 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 的摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，3 min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

①准确在 10 s 和 190 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板测定需使用多道移液器且分批测定，以确保组间反应时间一致；

②若 ΔA 大于 0.4，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定； ΔA 小于 0.02，建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（37°C 反应时间）后再进行测定，计算时相应修改；

③若 A1 大于 3.0，请检查 96 孔酶标板是否为 96 孔 UV 板，或比色皿是否为石英比色皿 (Q)；

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.

