



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

## 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸微板法)

### 简介:

4-香豆酸辅酶 A 连接酶是催化桂皮酸形成咖啡酸、香豆酸的酶, 该酶多存在于高等植物、酵母、菌类可溶性部分物质, 属于细胞木质素合成途径中间的关键酶, 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提高其品质提供依据。

源叶生物 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸微板法)检测原理是以香豆酸作为底物, 在酶促反应的最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法, 于酶标仪 333nm 处测定吸光度, 以吸光度变化所需酶量进行计算, 主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶活性, 尤其适用于测定水果中 4-香豆酸辅酶 A 连接酶活性。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 组成:

名称 \ 编号	R30307 60T <sup>®</sup>	Storage
试剂(A): 4CL Lysis Buffer	125ml	4℃ 避光
试剂(B): 4CL Assay Buffer	1.5ml	4℃ 避光
试剂(C): CoA-SH Solution	10ml	-20℃
试剂(D): 4CL 终止液(备选)	1ml	RT
试剂(E): 4CL 对照	1.5ml	RT
使用说明书	1 份	

### 自备材料:

- 1、蒸馏水、研钵或匀浆器
- 2、离心管或试管



### 3、冷冻离心机、水浴锅或恒温箱、96 孔板、酶标仪

#### 操作步骤(仅供参考):

##### 1、准备样品:

①植物样品: 取 0.5g 植物组织或水果中层果肉, 冰浴情况下充分捣碎研磨或匀浆, 加入 2ml 4CL Lysis Buffer 继续研磨或匀浆, 10000g 4℃ 离心 15~20min, 留取上清液, -20℃ 冻存, 用于 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的检测。

②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定, -20℃ 冻存, 用于 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的检测。

③细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如果有必要需进行适当匀浆, 10000g 4℃ 离心 15~20min, 取上清液, -20℃ 冻存, 用于 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的检测。

④高活性样品: 如果样品中含有较高活性的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶, 可以使用蒸馏水或 4CL Lysis Buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、4CL 加样: 按照下表设置对照孔、测定孔, 取出 CoA-SH Solution 等试剂恢复至室温溶解, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的 4CL 活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 如样品的较多样品可以设置 2 平行孔, 求平均值以使结果更可靠。

加入物(μl)	对照孔	测定孔
4CL 对照	17.5	—
待测样品	35	35
4CL Assay Buffer	—	17.5
CoA-SH Solution	157.5	157.5

3、4CL 测定: 立即用酶标仪, 以对照孔为对照, 测定 333nm 处测定孔的吸光度(测定孔与对照孔的差值即为  $A_{\text{测定}0}$ ), 40℃ 准确孵育待测样品 5min 后, 立即加入 0.05ml 4CL 终止液终止反应(备选方案), 用酶标仪以对照孔为对照, 测定 333nm 处测定孔的吸光度(测定孔与对照孔的差值即为  $A_{\text{测定}1}$ )。注意: 加入



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

4CL 终止液终止反应不是必须步骤, 可 40℃准确孵育 5min 后直接以酶标仪, 以对照孔为对照, 测定 333nm 处测定孔的吸光度( $A_{\text{测定1}}$ )。

## 计算:

4CL 活性单位的定义: 在该实验条件下, 每 1min 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

$$\text{组织样本 4CL(U)} = \{(A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定0}}) \times V_T\} / (W \times V_S \times 0.01 \times t)$$

式中:  $A_{\text{测定1}}$  = 孵育 5min 后测定孔的吸光度

$A_{\text{测定0}}$  = 加入 CoA-SH Solution 后立即测定的测定孔吸光度

$V_T$  = 提取酶液的总体积(ml)

$W$  = 组织样本的重量(g)

$V_S$  = 测定时所用酶液体积(ml)

$t$  = 反应时间

$$\text{液体样本 4CL(U)} = (A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定0}}) / (0.01 \times t)$$

式中:  $A_{\text{测定1}}$  = 孵育 5min 后测定孔的吸光度

$A_{\text{测定0}}$  = 加入 CoA-SH Solution 后立即测定的测定孔吸光度

$t$  = 反应时间

## 注意事项:

- 1、CoA-SH Solution 需避免反复冻融, 以免检测效率下降, 可分装成小份保存。
- 2、4CL 酶液提取时, 注意低温操作, 防止酶活性, 亦可 -20℃ 保存。
- 3、4CL 终止液具有一定腐蚀性, 请小心操作。
- 4、如果没有酶标仪, 也可以使用分光光度计测定, 每次检测指标不宜过多, 否则操作时间不一, 有可能导致样本间的差异。
- 5、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期:** 6 个月有效。