



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
邮箱: shyysw@sina.com

4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸比色法)

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(香豆酸比色法)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,于分光光度计 333nm 处检测吸光度,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,尤其适用于检测水果中 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	R30308 20T	Storage
试剂(A): 4CL Lysis Buffer	125ml	4℃ 避光
试剂(B): 4CL Assay Buffer	4ml	4℃ 避光
试剂(C): CoA-SH Solution	32ml	-20℃
试剂(D): 4CL 终止液(备选)	1ml	RT
试剂(E): 4CL 对照	4ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水、研钵或匀浆器、离心管或试管
- 2、低温离心机、水浴锅或恒温箱、比色杯、分光光度计

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 2.0ml 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 C4H Lysis buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、加样: 按照下表设置对照管、测定管, 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, 样品的检测最好能设置 2 平行管, 求平均值。

加入物(ml)	对照管	测定管
4CL 对照	0.175	—
待测样品	0.35	0.35
4CL Assay Buffer	—	0.175
CoA-SH Solution	1.575	1.575

3、4CL 检测: 立即以分光光度计, 比色杯光径 1.0cm, 以对照管为对照, 测定 333nm 处测定管的吸光度(测定管与对照管的差值即为 $A_{\text{测定}0}$)。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), 以分光光度计, 比色杯光径 1.0cm, 以对照管为对照, 测定 333nm 处测定管的吸光度(测定管与对照管的差值即为 $A_{\text{测定}1}$)。注意: 加入 4CL 终止液终止反应不是必须步骤, 可 40℃准确孵育 5min 后直接以分光光度计, 比色杯光径 1.0cm, 以对照



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
邮箱: shyysw@sina.com

管为对照, 测定 333nm 处测定管的吸光度($A_{\text{测定1}}$)。

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。

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

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

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

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、如果没有分光光度计, 也可以使用普通的酶标仪测定, 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。