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

肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)检测试剂盒(肉桂酸比色法)

简介：

肉桂酸-4-羟基化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 肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)检测试剂盒(肉桂酸比色法)检测原理是以肉桂酸作为底物，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，于分光光度计或酶标仪 290nm 处检测吸光度，以吸光度变化所需酶量进行计算。该试剂盒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肉桂酸-4-羟基化酶活性，尤其适用于检测水果中肉桂酸-4-羟基化酶活性，100T 该试剂盒可以检测 47~48 个样品。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：

编号 / 名称	R30306 100T	Storage
试剂(A): C4H Lysis Buffer	250ml	4℃ 避光
试剂(B): C4H Assay Buffer	5ml	4℃ 避光
试剂(C): NADPH	1 支	-20℃
试剂(D): C4H 终止液(备选)	10ml	RT
试剂(E): C4H 碱性基液(备选)	10ml	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

3、比色杯或 96 孔板、分光光度计或酶标仪

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，加入 2ml C4H Lysis Buffer，冰浴情况下充分捣碎研磨或匀浆，4℃ 10000 r/min 离心 15~20min，留取上清液，-20℃冻存，用于肉桂酸-4-羟基化酶的检测。

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，用于肉桂酸-4-羟基化酶的检测。

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，4℃ 10000g 离心 15~20min，取上清液，-20℃冻存，用于肉桂酸-4-羟基化酶的检测。

④高活性样品：如果样品中含有较高活性的肉桂酸-4-羟基化酶，可以使用蒸馏水或 C4H Lysis Buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、配制 NADPH 工作液：取 1 支 NADPH 加入 1ml 蒸馏水，充分溶解，即为 NADPH 工作液。该 NADPH 工作液 4℃保存 1 周，-20℃保存 2 个月。

3、C4H 加样：按照下表设置对照管、测定管，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 C4H 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
蒸馏水	1.69	1.64
待测样品	0.05	0.05
C4H Lysis Buffer	0.25	0.25
NADPH 工作液	0.01	0.01
C4H Assay Buffer	—	0.05

4、C4H 测定：以对照管为对照(调零)，比色杯光径 1cm，立即以分光光度计测定 290nm 处测定管的吸光度(记为 $A_{测定0}$)，37℃准确孵育 1h。立即加入

0.1ml C4H 终止液终止反应，用 C4H 碱性基液调节 pH 至约 11(如用 pH 计检测体积过小，亦可考虑用 pH 试纸，如无条件可省略该步骤)，以对照管为对照(调零)，比色杯光径 1cm，立即以分光光度计测定 290nm 处测定管的吸光度(记为 $A_{测定1}$)。

注意：加入 C4H 终止液终止反应不是必须步骤，**可 37℃准确孵育 1h 后直接以对照管为对照(调零)**，比色杯光径 1cm，立即以分光光度计测定 290nm 处测定管的吸光度(记为 $A_{测定1}$)；用酶标仪检测，体积可相应缩小，其余同分光光度计检测操作。

计算：

C4H 活性单位的定义：在该实验条件下，每 1h 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

组织样品 C4H[U/(g·h)]=$\{(A_{测定1}-A_{测定0})\times V_T\}/(W\times V_S\times 0.01\times t)$

式中：$A_{测定1}$=孵育 1h 后测定管的吸光度

$A_{测定0}$=加入 C4H Assay buffer 后测定管的吸光度

W=组织样品的重量(g)

V_T=提取酶液的总体积(ml)

V_S=测定时所用酶液体积(ml)

t=反应时间(h)=1

液体样品 C4H[U/(ml·h)]=$(A_{测定1}-A_{测定0})/(V_S\times 0.01\times t)$

式中：$A_{测定1}$=孵育 1h 后测定管的吸光度

$A_{测定0}$=加入 C4H Assay buffer 后测定管的吸光度

V_S=测定时所用酶液体积(ml)

t=反应时间(h)=1

注意事项：

1、待测样品中不能含有酶抑制剂，同时需避免反复冻融。

2、获得上清液为 C4H 酶液，应尽快检测，亦可-20℃保存。

3、加入 C4H 终止液终止反应后，最好采用 C4H 碱性基液调节 pH 至 11 左右，以便检测更为准确，亦可考虑用 pH 试纸，如无条件可省略该步骤。

4、C4H 碱性基液具有一定腐蚀性，请小心操作。

5、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，但本试剂盒不推荐用酶标仪检测，如需酶标仪检测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。

6、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。