



4-香豆酸：辅酶 A 连接酶活性检测试剂盒 4CL Assay Kit

微量法

产品编号：AK467M
产品规格：100T/48S
产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES467	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK467-A	25 mL×1 瓶	4℃保存；
AK467-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4-coumarate:CoA ligase, 4CL）是连接苯丙酸途径与木质素特异合成途径的关键酶，主要催化肉桂酸生成相应的肉桂酸辅酶 A 酯，是合成木质素与其他苯丙烷类化合物的代谢流向调控点。该酶主要存在于高等植物、酵母和菌类中，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而提高其品质提供依据。

原理：4CL 催化 4-香豆酸和 CoA 生成 4-香豆酸 CoA，在 333nm 下测 4-香豆酸 CoA 生成速率，即可反映 4CL 活性。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：ES467 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES467），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：ES467 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES467），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪 40℃预热 30min 以上，调节波长至 333nm，蒸馏水调零。
2. 准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。
3. 样本测定
 - （1）在 AK467-B 中加入 5mL AK467-A 充分溶解混匀，置于 40℃水浴预热 10min；现配现用，24h 内用完；
 - （2）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
样本	10	10
AK467-A	190	
AK467-B		190
混匀，立即记录 333nm 处 40℃反应 30min 后的吸光值 A1（对照管），A2（测定管），计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。每个测定管设一个对照管。		

4CL 活性计算公式：

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算:

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。

$$4CL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 31.75 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算:

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。

$$4CL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 31.75 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万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。

$$4CL \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.063 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数, 2.1×10^4 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 30 min;

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算:

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

$$4CL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 63.49 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算:

单位的定义: 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。

$$4CL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 63.49 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万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。

$$4CL \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.127 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数, 2.1×10^4 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 30 min;

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。