



肉桂酸-4-羟化酶活性检测试剂盒

C4H Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号：AK470U

产品规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES470	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK470-A	60 mL×1 瓶	4℃保存；
AK470-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：肉桂酸-4-羟化酶（Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H）多存在于高等植物、酵母、菌类中，该酶催化肉桂酸羟化作用产生 4-香豆酸盐，是苯丙烷途径中继 L-苯丙氨酸解氨酶之后的第二个关键酶。

原理：C4H 催化肉桂酸和 NADP 生成 4-香豆酸盐和 NADPH，在 340nm 下测定 NADPH 生成速率，即可反映 C4H 活性。

自备用品：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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）：ES470 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES470），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）：ES470 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES470），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 样本测定
 - 取 AK470-B 一瓶，加入 25mL AK470-A 充分溶解混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min，**现配现用，24h 用完。**
 - 在 1mL 比色皿中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	50
AK470-B	950
混匀，立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2， 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

C4H 活性计算公式：

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$C4H \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反应} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 643 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{C4H (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

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产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{C4H (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))