

使用说明书

Instruction Manual

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶活性检测试剂盒（微量法）

4CL Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0002M-ES	100mL×1 瓶	4℃保存
CB0002M-A	25mL×1 瓶	4℃保存
CB0002M-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存

注：正式实验前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预实验。

操作说明

1. 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。

2. 粗酶液提取：

- 1) 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）：CB0002M-ES 体积（mL）为 500- 1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0002M-ES），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。
- 2) 组织：按照组织质量（g）：CB0002M-ES 体积（mL）为 1：5- 10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0002M-ES），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3. 检测步骤：

- 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：
 - A. 在 CB0002M-B 中加入 5mL CB0002M-A 充分溶解混匀，置于 40℃水浴预热 10min；现配现用，24h 内用完；
 - B. 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
CB0002M-A	190	
CB0002M-B		190
混匀，立即记录 333nm 处 40°C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。		

4. 4CL 活性计算公式：

1) 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

A. 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。

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

B. 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。

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

C. 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 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 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 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。

2) 用 96 孔板测定的计算公式如下：

A. 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。

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

B. 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。

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

C. 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 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 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 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。

注意事项

- 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

