

使用说明书

Instruction Manual

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

4CL Assay Kit (UV Spectrophotometry)

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

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0002UV-ES	60mL×1 瓶	4℃保存
CB0002UV-A	60mL×1 瓶	4℃保存
CB0002UV-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、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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）：CB0002UV-ES 体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0002UV-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）：CB0002UV-ES 体积（mL）为 1：5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0002UV-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) 样本测定：
 - A. 在 CB0002UV-B 中加入 12.5mL CB0002UV-A 充分溶解混匀，置于 40℃水浴预热 10min；现配现用，24h 内用完。
 - B. 在微量石英比色中加入下列试剂：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
样本	50	50
CB0002UV-A	950	
CB0002UV-B		950
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) 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 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.05 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

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 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。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

