

**4-香豆酸：辅酶A连接酶（4-coumarate:CoA ligase, 4CL）****试剂盒说明书**

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体25 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2瓶，-20℃保存；

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<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），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）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），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）在试剂二中加入5mL试剂一充分溶解混匀，置于**40℃水浴预热10min**；**现配现用（配好后24h内用完）**；

（2）对照管：在微量石英比色皿或96孔UV板中加入10μL样本和190μL试剂一，混匀，立即记录333nm处**40℃反应30min**后的吸光值A1。

（3）测定管：在微量石英比色皿或96孔UV板中加入10μL样本和190μL试剂二，混匀，立即记录333nm处**40℃反应30min**后的吸光值A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。每个测定管设一个对照管。

4CL活性计算:

**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。

$$4CL (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 31.75 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$4CL (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 31.75 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$4CL (\text{nmol/min/104 cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.063 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 4-香豆酸辅酶A摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  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。

**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。

$$4CL (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 63.49 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$4CL (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 63.49 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$4CL (\text{nmol/min/104 cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.127 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 4-香豆酸辅酶A摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  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。