

肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)试剂盒说明书

微量法 100管/96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：

C4H又称反式肉桂酸-4-单氧化酶，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。

测定原理：

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。

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、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（10⁴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预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

(1) 取试剂二一瓶，加入10mL试剂一充分溶解混匀，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；**现配现用（配好后24h内用完）**；

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本和190μL试剂二，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：

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。

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

(2) 按样本鲜重计算：

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

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

(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。

$$C4H \text{ (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.01 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。

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。

$$C4H \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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

$$C4H \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$C4H \text{ (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 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，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。