

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。

自备仪器和样品：

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（ 10^4 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 $\Delta A=A2-A1$ 。

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

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

(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。

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

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。

$$C4H (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

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。