4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）活性检测试剂盒

4-Coumarate: Coenzyme A Ligase (4CL) Activity Assay Kit

北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）活性检测试剂盒

4-Coumarate: Coenzyme A Ligase (4CL) Activity Assay Kit

一、产品描述

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）是木质素生物合成的关键酶之一，位于苯丙酸途径与木质素特异合成途径的转折点上，能够催化肉桂酸及其羟基或者甲氧基衍生物生成相应的辅酶 A 酯，产物随后进入苯丙类衍生物支路合成途径。4-香豆酸：辅酶 A 连接酶主要存在于高等植物、酵母和菌类中，其活性测定对多种生物细胞发育过程中木质素沉积代谢机理研究具有重要意义。

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶能够催化 4-香豆酸和 CoA 生成 4-香豆酸 CoA，产物在 333 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征 4-香豆酸：辅酶 A 连接酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	**内含不溶物，摇匀后使用即可**
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存	**使用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解** （分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融）
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C避光保存	**使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解** （分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融）
试剂五	粉剂×1 支	4°C避光保存	**使用前加入 1 mL 无水乙醇充分溶解** （配制后 4°C可保存 1 个月，注意密封保存）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、**96 孔 UV 板**、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按细菌或细胞数量（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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min，调节波长至 333 nm。

②**试剂五应用液的制备（现用现配）：**使用前根据使用量，按试剂五：蒸馏水=1:39 的体积比配制，充分混匀即为试剂五应用液。

③**检测工作液的制备（现用现配）：**使用前根据使用量，按试剂二：试剂三：试剂四：试剂五应用液=1:1:1:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。

④在 **96 孔 UV 板**中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（μL）	空白组（μL）
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	100	100
检测工作液	80	80

吸光值测定：①充分混匀并开始计时，测定 333 nm 处初始吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37℃恒温准确反应 1 h，测定 1 h 时 333 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 空白=A2 空白-A1 空白，ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3. 4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL（U/mg\ prot）= \frac{\Delta A \times V_{反总} \times 10^9 \times D}{\varepsilon \times d \times Cpr \times V_{样} \times T} = \frac{793.65 \times \Delta A \times D}{Cpr}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL（U/g）= \frac{\Delta A \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9 \times D}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{793.65 \times \Delta A \times D}{W}$$

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每小时生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL（U/10^4\ cell）= \frac{\Delta A \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9 \times D}{\varepsilon \times d \times 细菌或细胞数量 \times V_{样} \times T} = \frac{793.65 \times \Delta A \times D}{细菌或细胞数量}$$

④按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每小时生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL（U/mL）= \frac{\Delta A \times V_{反总} \times 10^9 \times D}{\varepsilon \times d \times V_{样} \times T} = 793.65 \times \Delta A \times D$$

注释：V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；ε：4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数，2.1×10^4 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.6 cm；T：酶促反应时间，1 h；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量，以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1。

四、注意事项

①若 A1 测定大于 3.0，建议检查 96 孔板是否为 96 孔 UV 板，普通 96 孔板会因材质问题造成吸光值接近设备量程；

②吸光值正常范围：A1 测定和 A2 测定在 0.02-1.5 之间，且 ΔA 在 0.02-0.5 之间；若吸光值未在正常范围内，可参照表格方案进行调整，计算时相应修改计算公式参数即可，建议做好预实验。

问题类型		调整粗酶液浓度		调整酶促反应时间	
A1 测定和 A2 测定（正常范围 0.02-1.5）	ΔA（正常范围 0.02-0.5）	稀释粗酶液	制备更高浓度	延长时间	缩短时间
高于 1.5	正常	√	-	-	-
高于 1.5	高于 0.5	√	-	-	-
正常	低于 0.02	-	√	√	-
正常	高于 0.5	√	-	-	√

注：①粗酶液可使用蒸馏水进行稀释，稀释倍数需进行预实验；②制备更高浓度样本只适用于组织和细胞/细胞类样本，组织类样本粗酶液浓度可由 10%（w/v）最高提高至 20%（w/v），细胞类样本粗酶液浓度可由 500 万/mL 最高提高至 2000 万/mL；③延长酶促反应时间最长可延长至 6 h；④若上述方法尝试仍无法达到吸光值要求，请及时与 Boxbio 技术支持联系：400-805-8228（7×24 h）。

③准确在相应时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性，若样本较多时建议使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。