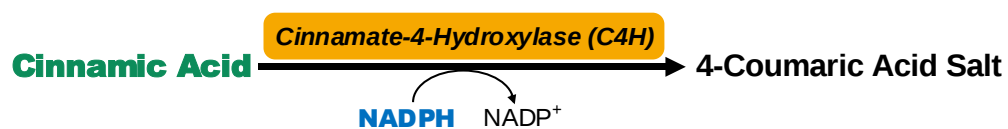




肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性检测试剂盒

Cinnamate-4-Hydroxylase (C4H) Activity Assay Kit



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



肉桂酸-4-羟化酶（C4H）活性检测试剂盒

Cinnamate-4-Hydroxylase (C4H) Activity Assay Kit

一、产品描述

肉桂酸-4-羟化酶（Cinnamate 4-Hydroxylase, C4H）是苯丙烷代谢途径中的关键酶之一，属于细胞色素 P450 单加氧酶超家族的成员，主要催化反式肉桂酸在苯环的 4 位上进行羟基化反应生成 4-香豆酸，在木质素、黄酮类和芳香类等次级代谢产物的生物合成过程中发挥重要作用。

肉桂酸-4-羟化酶能够催化肉桂酸和 NADPH 生成 4-香豆酸盐和 NADP^+ ，NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化速率即可表征肉桂酸-4-羟化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 45 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 3 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)
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 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)

需自备试剂：无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, MW=46.07, CAS:64-17-5)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿（光径 10 mm）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、无水乙醇和蒸馏水。

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 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4°C 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

③培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测，若样本浑浊需离心后取上清测定。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将试剂一置于 37°C 预热 10 min 以上；
- ③在 1 mL 石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)
试剂一	700
试剂二	100
试剂三	100
粗酶液	100

- 吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1；
②37°C 准确反应 180 s，测定 190 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3.肉桂酸-4-羟化酶（C4H）活性计算

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{535.91 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

- ②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{535.91 \times \Delta A}{W}$$

- ③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{535.91 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

- ④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 535.91 \times \Delta A$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.1 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，3 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①准确在 10 s 和 190 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；
- ②若 ΔA 大于 0.4，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定； ΔA 小于 0.02，建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（37°C 反应时间）后再进行测定，计算时相应修改；
- ③若 A1 大于 3.0，请检查比色皿是否为石英比色皿（Q）；
- 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。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

