

肉桂酸-4-羟化酶（C4H）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC4085

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	2-8℃保存

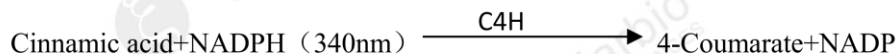
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一瓶粉剂加入 2 mL 乙醇溶解备用。2-8℃保存 4 周。
- 2、试剂三：临用前取一瓶粉剂加入 2 mL 双蒸水充分溶解待用。现配现用。 -20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

C4H又称反式肉桂酸-4-单氧化酶，是催化桂皮酸形成咖啡豆、香豆酸的酶。C4H多存在于高等植物、酵母、菌类中，属于细胞木质素合成途径中间的关键酶。

C4H催化肉桂酸和NADPH生成4-香豆酸盐和NADP，在340nm下测定NADPH的减少速率，即可反映C4H活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器、乙醇（>98%，AR）、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12000g 4℃离心 15 分钟，取上清，置冰上待测。
- 2、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。12000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min，波长调至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
- 2、加样表（微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入）

试剂名称（μL）	测定管
----------	-----





试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
样本	20

充分混匀后立即测定 10s 时在 340nm 下的吸光度，记为 A1，之后迅速将其放入 37℃水浴或 37℃培养箱中 3min（若酶标仪带有控温功能，将温度调为 37℃）。然后迅速拿出擦净后测定 190s 时的吸光度，记为 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、C4H酶活计算

A、按微量石英比色皿计算：

1、按蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟减少1nmol NADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞或细菌个数计算：

单位的定义：每10⁴个细胞或细菌在反应体系中每分钟减少1nmolNADPH的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{C4H酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

V反总：反应总体积，2×10⁻⁴L； ϵ ：NADPH的摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V样：加入的样本体积，0.02mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V提取：提取液体积，1mL；500：500万个细胞；T：反应时间，3min；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

B、按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔UV板）进行计算即可。

注意事项：

当 ΔA 大于0.4时，建议将样本用提取液稀释后测量； ΔA 过小时，建议增加酶促反应时间（5min或10min）或增加加入的样本体积来测定。

实验实例：

1. 取 0.1g 黄豆（发芽）加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，使用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 1.1227 - 0.9854 = 0.1373$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{C4H 酶活 (U/g 质量)} = 535.91 \times \Delta A \div W = 535.91 \times 0.1373 \div 0.1 = 735.80 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献：

- [1] Chen Y, Li D, Zhang X, Ma Q, Xu Y, Luo Z. Azacytidine-induced hypomethylation delays senescence and coloration in harvested strawberries by stimulating antioxidant enzymes and modulating abscisate metabolism to minimize anthocyanin overproduction. Food Chem. 2023 May 1; 407:135189. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135189. Epub 2022 Dec 10. PMID: 36525805.
- [2] Wang C, Chen Y, Chen S, Min Y, Tang Y, Ma X, Li H, Li J, Liu Z. Spraying chitosan on cassava roots reduces postharvest deterioration by promoting wound healing and inducing disease resistance. Carbohydr Polym. 2023 Oct 15; 318:121133. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121133. Epub 2023 Jun 19. PMID: 37479443.



- [3] Yang J, Song J, Feng Y, Cao Y, Fu B, Zhang Z, Ma N, Li Q, Hu T, Wang Y, Yang P. Osmotic stress-induced lignin synthesis is regulated at multiple levels in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Int J Biol Macromol*. 2023 Aug 15; 246:125501. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125501. Epub 2023 Jun 20. PMID: 37348591.
- [4] Gong X, Qi K, Chen J, Zhao L, Xie Z, Yan X, Khanizadeh S, Zhang S, Tao S. Multi-omics analyses reveal stone cell distribution pattern in pear fruit. *Plant J*. 2023 Feb;113(3):626-642. doi: 10.1111/tpj.16073. Epub 2023 Jan 19. PMID: 36546867.

相关系列产品:

BC1360/BC1365 尿酸 (UA) 含量检测试剂盒

BC1340/BC1345 植物总酚 (TP) 含量检测试剂盒

BC1330/BC1335 植物类黄酮含量检测试剂盒

