

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4CL）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: BC4220

规格: 50T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀；
- 2、试剂二：临用前加入 6 mL 蒸馏水溶解，可以分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 3、试剂四：临用前用 6 mL 蒸馏水溶解备用，可以分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 4、试剂五：加入 1 mL 乙醇溶解，临用前用蒸馏水稀释 40 倍后备用，现用现配；
- 5、工作液的配制：按体积比将试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=1:1:1:1 的比例配制工作液，现用现配。

产品说明：

4-香豆酸：辅酶A连接酶（4-coumarate:CoA ligase, 4CL）是木质素生物合成的关键酶之一，主要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，这些中间产物随后进入苯丙类衍生物支路合成途径。该酶主要存在于高等植物、酵母和菌类中，研究该酶可以探讨多种生物细胞发育过程中木质素沉积的代谢机理，为减少水果石细胞含量而提高其品质提供依据。

4CL催化4-香豆酸和CoA生成4-香豆酸CoA，其在333nm下测有特征吸收峰，测定4-香豆酸CoA的生成速率，即可反映4CL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、低温台式离心机、水浴锅、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管、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、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。

2、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。





二、测定步骤

1、紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 333nm，蒸馏水调零。

2、操作表（在 1.5mLEP 管中进行下列操作）：

	测定管	空白管
样本（μL）	100	-
蒸馏水（μL）	-	100
工作液（μL）	400	400
试剂一（μL）	500	500
充分混匀后测定 333nm 下的 10s 初始值 A1，37°C 反应 1h 后再次测定 1h 10s 吸光值 A2，计算 ΔA 测定管=A2 测定管-A1 测定管， ΔA 空白管= A2 空白管-A1 空白管， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白		

三、4CL 活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算：

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

$$4CL (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 476.19 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算：

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

$$4CL (U/g \text{ 质量}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 476.19 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每小时生成 1nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.9124 \times \Delta A$$

V 反应：反应体系总体积，1×10⁻³L；ε：4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数，2.1×10⁴L/mol/cm；d：1mL 石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1h；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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

注意事项：

- 1、若 ΔA 大于 0.5，将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 2、建议一次测定不要测定过多样本以免耽误过多的酶促反应时间。
- 3、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过 0.01。

实验实例：

1、取 0.1g 芥菜加 1mL 提取液进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，测得 ΔA 测定管=A2 测定管-A1 测定管=0.784-0.655=0.129， ΔA 空白管= A2 空白管-A1 空白管=0， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.129，按样本质量计算酶活得：

$$4CL (U/g \text{ 质量}) = 476.19 \times \Delta A \div W = 476.19 \times 0.129 \div 0.1 = 614.29 U/g \text{ 质量}。$$

相关发表文献：

[1] 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.



[2] Chen C, Peng X, Wan C, Zhang Y, Gan Z, Zeng J, Kai W, Chen J. Lignin Biosynthesis Pathway and Redox Balance Act Synergistically in Conferring Resistance against *Penicillium italicum* Infection in 7-Demethoxytylophorine-Treated Navel Orange. *J Agric Food Chem*. 2022 Jul 6;70(26):8111-8123. doi: 10.1021/acs.jafc.2c02348. Epub 2022 Jun 22. PMID: 35730981.

[3] Lao R, Guo Y, Hao W, Fang W, Li H, Zhao Z, Li T. The Role of Lignin in the Compartmentalization of Cadmium in Maize Roots Is Enhanced by Mycorrhiza. *J Fungi (Basel)*. 2023 Aug 15;9(8):852. doi: 10.3390/jof9080852. PMID: 37623623; PMCID: PMC10455880.

[4] Kang L, Wu Y, Jia Y, Chen Z, Kang D, Zhang L, Pan C. Nano-selenium enhances melon resistance to *Podosphaera xanthii* by enhancing the antioxidant capacity and promoting alterations in the polyamine, phenylpropanoid and hormone signaling pathways. *J Nanobiotechnology*. 2023 Oct 16;21(1):377. doi: 10.1186/s12951-023-02148-y. PMID: 37845678; PMCID: PMC10577987.

[5] Jia L, Li Y, Liu G, He J. UV-C delays senescence in 'Lingwu long' jujube fruit by regulating ROS and phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiol Biochem*. 2023 Jan;194:383-393. doi: 10.1016/j.plaphy.2022.11.030. Epub 2022 Nov 26. PMID: 36473328.

参考文献:

[1] Min-Soo Yun, Weijun Chen, Fan DENG. et al. Differential Properties of 4-Coumarate: CoA Ligase Related to Growth Suppression by Chalcone in Maize and Rice [J]. *Plant Growth Regulation*, 2005, 46(2): 169-176.

相关系列产品:

BC2010/BC2015 乙醇酸氧化酶 (GO) 活性检测试剂盒

BC4170/BC4175 肉桂醇脱氢酶 (CAD) 活性检测试剂盒

BC4180/BC4185 莽草酸脱氢酶 (SD) 活性检测试剂盒

BC4200/BC4205 木质素含量检测试剂盒

