

肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)**试剂盒说明书**

分光光度法 50 管/48 样

注意：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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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 60 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 25mL 试剂一充分溶解混匀, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min; 现配现用 (配好后 24h 内用完);
 - (2) 在 1mL 石英比色皿中加入 50μL 样本和 950μL 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

C4H 活性计算:

- (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。

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

- (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。

$$\text{C4H (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

- (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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} 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, 0.05 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。