肉桂酸 4-羟基化酶（C4H）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

肉桂酸-4-羟基化酶（C4H，EC 1.14.13.11）是苯丙烷类代谢途径的关键酶。可有效调节与之相应的黄酮类化合物等次生代谢产物的合成，其活性可作为植物抗性的一个生理指标。

本产品测试原理是以肉桂酸作为底物，在酶促反应的最适条件下，肉桂酸-4-羟基化酶催化底物生成 4-羟基反式肉桂酸，其在最佳 PH 值下，产物 4-羟基反式肉桂酸在 340nm 下有最大吸收峰，进而计算出该酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	试剂规格	保存方式	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存	用前甩几下使粉剂落入底部，每瓶再加 20mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，一周内用完。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需用的仪器与用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、肉桂酸 4-羟基化酶（C4H）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液组织，进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	100	
试剂一	50	50
试剂二	350	350
试剂三	300	400
混匀，30℃水浴反应 30min		
试剂四	50	50
混匀，静置 2min		
试剂五	60	60
混匀后，取 200μL 转移至 96 孔板，在 340nm 下读取吸光值 A，△A=A 测定-A 空白。		

【注】若△A 的值在零附近徘徊，可增加样本加样量（如增加至 200μL，则试剂三相应减少）或增加反应时间 T，则改变后的加样体积 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1. 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1nmol 的 4-羟基反式肉桂酸为一个酶活力单位。

C4H(nmol/min/g 鲜重)=[(△A÷ε÷d×V2×10^9)] ÷(W×V1÷V)÷T=24.8×ΔA÷W

2. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 的 4-羟基反式肉桂酸为一个酶活力单位。

C4H(nmol/min/mg prot)=[(△A÷ε÷d×V2×10^9)]÷(V1×Cpr)÷T=24.8×ΔA÷Cpr

ε ---4-羟基反式肉桂酸在此反应条件下于 340nm 处的摩尔吸光系数，2.45×10^4 L/mol /cm；

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入样本体积，0.1 mL；

V2 ---反应体系总体积，910μL=9.1×10^{-4} L；　　d --96 孔板光径，0.5 cm；

T---反应时间，30 min；　　W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。