

查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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：

查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)是第一个被认识的黄酮类化合物合成相关酶,也是黄酮代谢途径中的关键酶之一。查尔酮异构酶和查尔酮合酶一起构成了黄酮类化合物生物合成的限速酶。

测定原理：

查尔酮异构酶 (CHI) 催化查尔酮环化形成 4,5,7-三羟基黄酮, 通过测定 381nm 下的吸光度变化表示 CHI 的活性。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；用时加入 20mL 试剂一充分溶解待用；用不完的试剂 4℃ 保存。

粗酶液提取：

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 381nm，蒸馏水调零。

2、样本测定表

在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 上清液和 190μL 试剂二，立即混匀并记录 381nm 下初始吸光值 A1 和 37℃ 保温 30min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

CHI 活性计算：

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时 A381 变化 0.1 为一个酶活力单位。

$$\text{CHI (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.1 \div T = 400 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每小时 A381 变化 0.1 为一个酶活力单位。

$$\text{CHI (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.1 \div T = 400 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.01mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，0.5h； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量。

用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时 A381 变化 0.05 为一个酶活力单位。

$$\text{CHI (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.05 \div T = 800 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每小时 A381 变化 0.05 为一个酶活力单位。

$$\text{CHI (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.05 \div T = 800 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.01mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，0.5h； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量。