

4-香豆酸：辅酶 A 连接酶（4-coumarate:CoA ligase, 4CL）

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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：

4CL 是连接苯丙酸途径与木质素特异合成途径的关键酶，主要催化肉桂酸生成相应的肉桂酸辅酶 A 酯，是合成木质素与其他苯丙烷类化合物的代谢流向调控点。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。

测定原理：

4CL 催化 4-香豆酸和 CoA 生成 4-香豆酸 CoA，在 333nm 下测 4-香豆酸 CoA 生成速率，即可反映 4CL 活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、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 25 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 **40℃ 预热** 30min 以上，调节波长至 333nm，蒸馏水调零。
- 2、准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。
- 3、样本测定
 - （1）在试剂二中加入 5mL 试剂一充分溶解混匀，置于 **40℃ 水浴预热** 10min；**现配现用（配好后 24h 内用完）**；
 - （2）对照管：在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 试剂一，混匀，立即记录 333nm 处 **40℃ 反应 30min** 后的吸光值 A1。
 - （3）测定管：在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 试剂二，混匀，立即记录 333nm 处 **40℃ 反应 30min** 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。每个测定管设一个对照管。

4CL 活性计算:

a. 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 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 31.75 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$4CL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 31.75 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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

$$4CL \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.063 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数, 2.1×10^4 L / mol / cm;
d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;
T: 反应时间, 30 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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 63.49 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 63.49 \times \Delta A \div W$$

(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生成 1 nmol 4-香豆酸辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$4CL \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.127 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 4-香豆酸辅酶 A 摩尔消光系数, 2.1×10^4 L / mol / cm;
d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;
T: 反应时间, 30 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。