4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸微板法)

产品简介:

4-香豆酸辅酶 A 连接酶是催化桂皮酸形成咖啡酸、香豆酸的酶，该酶多存在于高等植物、酵母、菌类可溶性部分物质，属于细胞木质素合成途径中间的关键酶，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提高其品质提供依据。

4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)检测试剂盒(香豆酸微板法)检测原理是以香豆酸作为底物，在酶促反应的最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法，于酶标仪333nm处测定吸光度，以吸光度变化所需酶量进行计算，主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶活性，尤其适用于测定水果中 4-香豆酸辅酶 A 连接酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0411 60T	Storage
试剂(A): 4CL Lysis Buffer	125ml	4℃ 避光
试剂(B): 4CL Assay Buffer	1.5ml	4℃ 避光
试剂(C): CoA-SH Solution	10ml	-20℃
试剂(D): 4CL 终止液(备选)	1ml	RT
试剂(E): 4CL 对照	1.5ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 蒸馏水

2、 研钵或匀浆器、离心管或试管、冷冻离心机、水浴锅或恒温箱、96 孔板、酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、 准备样品:

①植物样品：取 0.5g 植物组织或水果中层果肉，冰浴情况下充分捣碎研磨或匀浆，加入 2ml 4CL Lysis Buffer 继续研磨或匀浆，10000g 4℃离心 15~20min，留取上清液，-20℃冻存，用于 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的检测。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，-20℃冻存，用于 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的检测。

③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如果有必要需进行适当匀浆，10000g 4℃

离心 15~20min，取上清液，-20℃冻存，用于 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的检测。

④高活性样品：如果样品中含有较高活性的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶，可以使用蒸馏水或 4CL Lysis Buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、 4CL 加样：按照下表设置对照孔、测定孔，取出 CoA-SH Solution 等试剂恢复至室温溶解，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的 4CL 活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，如样品的较多样品可以设置 2 平行孔，求平均值以使结果更可靠。

加入物(μl)	对照孔	测定孔
4CL 对照	17.5	—
待测样品	35	35
4CL Assay Buffer	—	17.5
CoA-SH Solution	157.5	157.5

3、 4CL 测定：立即用酶标仪，以对照孔为对照，测定 333nm 处测定孔的吸光度(测定孔与对照孔的差值即为 $A_{测定0}$)，40℃准确孵育待测样品 5min 后，立即加入 0.05ml 4CL 终止液终止反应(备选方案)，用酶标仪以对照孔为对照，测定 333nm 处测定孔的吸光度(测定孔与对照孔的差值即为 $A_{测定1}$)。注意：加入 4CL 终止液终止反应不是必须步骤，可 40℃准确孵育 5min 后直接以酶标仪，以对照孔为对照，测定 333nm 处测定孔的吸光度($A_{测定1}$)。

计算：

4CL 活性单位的定义：在该实验条件下，每 1min 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

组织样本 4CL(U)=$\{(A_{测定1}-A_{测定0})\times V_T\}/(W\times V_S\times 0.01\times t)$

液体样本 4CL(U)=$(A_{测定1}-A_{测定0})/(0.01\times t)$

式中：$A_{测定1}$=孵育 5min 后测定孔的吸光度

$A_{测定0}$=加入 CoA-SH Solution 后立即测定的测定孔吸光度

V_T=提取酶液的总体积(ml)

W=组织样本的重量(g)

V_S=测定时所用酶液体积(ml)

t=反应时间

注意事项：

1、 CoA-SH Solution 需避免反复冻融，以免检测效率下降，可分装成小份保存。

2、 4CL 酶液提取时，注意低温操作，防止酶活性，亦可-20℃保存。

3、 4CL 终止液具有一定腐蚀性，请小心操作。

4、 如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。

5、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

6、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期： 6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)

