

肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD) 试剂盒说明书 (分光法 48 样)

一、产品简介:

肉桂醇脱氢酶(CAD, EC 1.1.1.195) 是作为植物次生代谢特别是木质素合成的关键酶, 与植物生长发育和抵御病原菌入侵关系密切。本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: CAD 催化肉桂醇和 NADP^+ 生成肉桂醛和 NADPH , 进而与特异的显色剂反应产生有色物质, 通过检测有色物质的增加速率, 进而计算出 CAD 酶活性的大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体×1 支	4°C 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4°C 保存	临用前加入 28mL 试剂四充分溶解; 用不完的试剂 4°C 保存;
试剂四	液体 32mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、肉桂醇脱氢酶 (CAD) 活性测定:

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

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C 离心 15min, 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 的比例提取

② 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。

② 试剂放在 37°C 水浴 5min;

③ 按照下表在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入试剂:

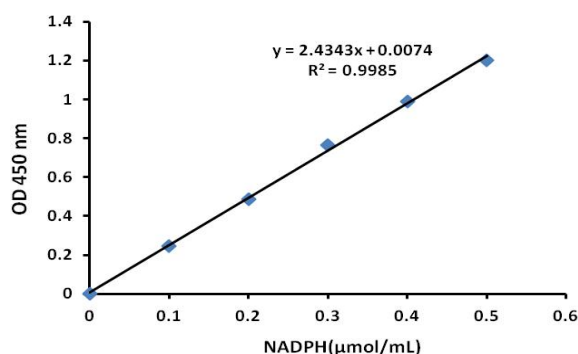
试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	160
试剂二	40
试剂三	520
混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 避光孵育 30min 后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 若 ΔA 在零附近徘徊, 可延长反应时间 T (如: 40min 或更长), 或加大样本量 V1 (如增至 160 μL , 则试剂三相应减少), 重新

调整后的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 2.4343x + 0.0074$ ，x 是 NADPH 摩尔浓度： $\mu\text{mol/mL}$ ，y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：在 37°C ，每毫克组织蛋白每分钟使 1 nmol 肉桂醇氧化成 1 nmol 肉桂醛并且使 1 nmol NADP^+ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0074) \div 2.4343 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 13.7 \times (\Delta A - 0.0074) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位的定义：在 37°C ，每毫克组织蛋白每分钟使 1 nmol 肉桂醇氧化成 1 nmol 肉桂醛并且使 1 nmol NADP^+ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0074) \div 2.4343 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 13.7 \times (\Delta A - 0.0074) \div W \end{aligned}$$

4、液体样本中 CAD 活力计算：

单位的定义：在 37°C ，每毫克组织蛋白每分钟使 1 nmol 肉桂醇氧化成 1 nmol 肉桂醛并且使 1 nmol NADP^+ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0074) \div 2.4343 \times V1 \times 10^3] \div V1 \div T = 13.7 \times (\Delta A - 0.0074)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08 mL；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ($1\mu\text{mol}/\text{ml}$)：向标准品 EP 管里面加入 1.2ml 蒸馏水。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 $80\mu\text{L}$ 标准品 + $40\mu\text{L}$ 试剂二 + $680\mu\text{L}$ 试剂四，混匀后室温 5min 后于 450nm 处读数，根据结果即可制作标准曲线。