

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

(货号: BP10107F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 2mL×1 支	-20℃避光保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 临用前加入 28mL 试剂四充分溶解; 2. 用不完的试剂 4℃保存;
试剂四	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

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℃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、检测步骤

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

② 试剂放在 37℃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:

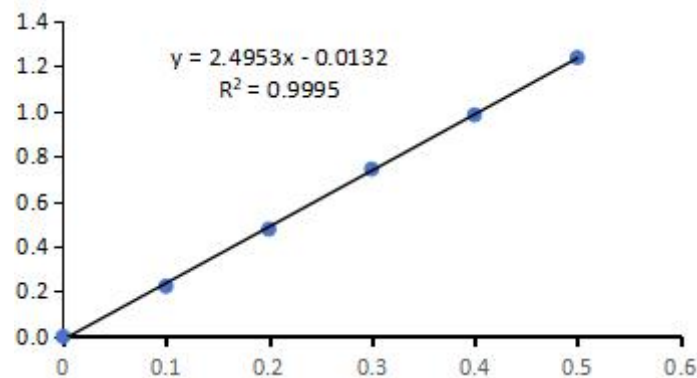
试剂组分 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	160

试剂二	40
试剂三	520
混匀，立即 450nm 下读取 A1 值，37°C 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 μ L，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： $y = 2.4953x - 0.0132$ ，x 是 NADPH 摩尔浓度： μ 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。

$$\text{CAD}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0132) \div 2.4953 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 13.4 \times (\Delta A + 0.0132) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{CAD}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0132) \div 2.4953 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 13.4 \times (\Delta A + 0.0132) \div W$$

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。

$$\text{CAD}(\text{nmol/min /mL}) = [(\Delta A + 0.0132) \div 2.4953 \times V1 \times 10^3] \div V1 \div T = 13.4 \times (\Delta A + 0.0132)$$

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 向标准品 EP 管里面加入 1.2ml 蒸馏水，标准品母液浓度为 1 μ mol /ml。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/ml。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500 μ L，加入 500 μ L 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/ml 的标品稀释液待用。						
标品浓度	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

$\mu\text{mol/ml}$						
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂二	40	40
试剂四	680	680
混匀后室温 5min 后于 450nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		