

肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD) 试剂盒说明书 (G1002W 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体×1 支	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 14mL 提取液充分溶解, 制备成反应 mix; 用不完的试剂 4℃ 保存;
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上, 温度设定 37℃, 调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min;

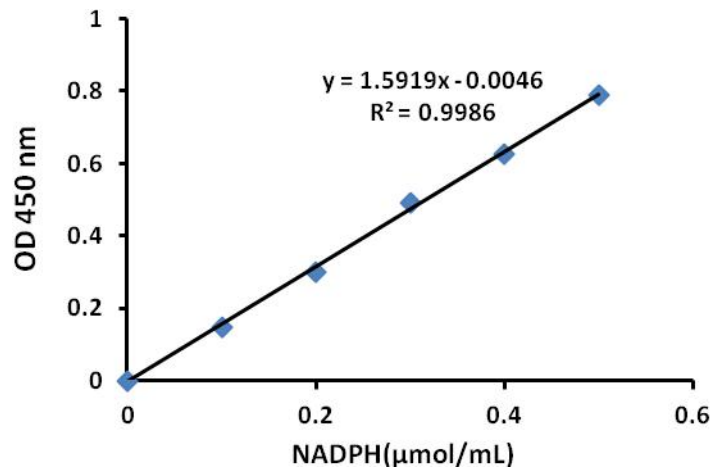
③ 按照下表在 96 孔板中依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	40
试剂二	10
试剂三	130
混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 避光孵育 30min 后读取 A2 值。ΔA=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 50μL, 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： $y=1.5919x-0.0046$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{CAD (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0046) \div 1.5919 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 20.94 \times (\Delta A + 0.0046) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{CAD (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0046) \div 1.5919 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 20.94 \times (\Delta A + 0.0046) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\text{CAD (nmol/min /mL)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 1.5919 \times V1 \times 10^3] \div V1 \div T = 20.94 \times (\Delta A + 0.0046)$$

V：加入提取液体积， 1 mL ；

V1：加入样本体积， 0.02 mL ；

T：反应时间， 30 min ；

Cpr：样本蛋白质浓度， mg/mL ；

W：样本质量， g 。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ($0.5\mu\text{mol/ml}$)：向标准品 EP 管里面加入 0.6ml 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品： $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\mu\text{mol/ml}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。