

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 30μL×1 支	4℃保存	临用前用几下使液体落入底部,分别取 2μL 液体至四个新 EP 管中,再分别加 1.5mL 无水乙醇溶解;用不完的试剂 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 试剂四充分溶解;用不完的试剂 4℃保存。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	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、无水乙醇、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:

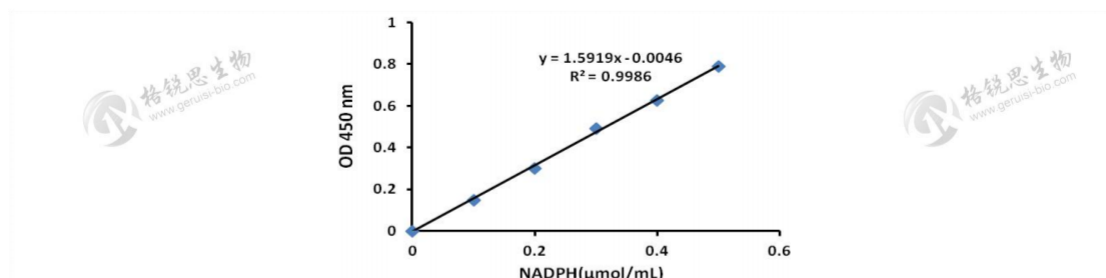
试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	40
试剂二	10
试剂三	130
混匀,立即 450nm 下读取 A1 值,37℃避光孵育 30min 后读取 A2 值。 $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】:若 ΔA 小于 0.01,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 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。

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

$$= 20.94 \times (\Delta A + 0.0046) \div \text{Cpr}$$

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。

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

$$= 20.94 \times (\Delta A + 0.0046) \div W$$

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。

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

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;

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 ($1\mu\text{mol/mL}$): 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 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 20 μL 标准品 + 10 μL 试剂二 + 170 μL 试剂四, 混匀后室温 5min 后于 450nm 处读值, 根据结果即可制作标准曲线。