

## Cinnamyl-alcohol dehydrogenase Activity Assay Kit

### 肉桂醇脱氢酶 (CAD)试剂盒说明书

货号: G1002F | 方法: 可见分光法 | 规格: 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<sup>+</sup>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 30μL×1 支 | 4°C保存 | 临用前甩几下使液体落入底部, 分别取 3μL 液体至五个新 EP 管中, 再分别加 2mL 无水乙醇溶解; 用不完的试剂 4°C保存。 |
| 试剂二  | 液体×1 瓶      | 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、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

##### 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:

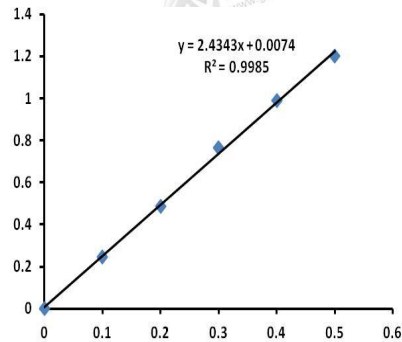
| 试剂名称 (μL)                       | 测定管 |
|---------------------------------|-----|
| 样本                              | 80  |
| 试剂一                             | 160 |
| 试剂二                             | 40  |
| 试剂三                             | 520 |
| 混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 37°C避光孵育 |     |

30min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

## 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  $\Delta A$ 。



2 标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：在  $37^{\circ}\text{C}$ ，每毫克组织蛋白每分钟使  $1 \text{ nmol}$  肉桂醇氧化成  $1 \text{ nmol}$  肉桂醛并且使  $1 \text{ nmol NADP}^+$  转换成  $1 \text{ nmol NADPH}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ ，每毫克组织蛋白每分钟使  $1 \text{ nmol}$  肉桂醇氧化成  $1 \text{ nmol}$  肉桂醛并且使  $1 \text{ nmol NADP}^+$  转换成  $1 \text{ nmol NADPH}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ ，每毫克组织蛋白每分钟使  $1 \text{ nmol}$  肉桂醇氧化成  $1 \text{ nmol}$  肉桂醛并且使  $1 \text{ nmol NADP}^+$  转换成  $1 \text{ nmol NADPH}$  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。