

肉桂醇脱氢酶(CAD)检测试剂盒(肉桂酸微板法)

产品简介

肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase,CAD)是催化香豆醛形成松柏醇的酶。该酶多存在于高等植物、酵母、菌类可溶性部分物质,属于细胞木质素合成途径中间的关键酶,研究该酶可以探讨多种生物细胞发育过程中木质素沉积的代谢机理,为减少水果石细胞含量提高其品质提供依据。

肉桂醇脱氢酶(CAD)检测试剂盒(肉桂酸比色法)检测原理是以肉桂酸、NADP作为底物,在酶促反应的最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法,于酶标仪340nm处检测吸光度,以吸光度变化所需酶量进行计算,主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的肉桂醇脱氢酶活性,尤其适用于检测水果中肉桂醇脱氢酶活性,60T可以检测约57~58个样品。该产品仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称 \ 编号	ADS047TE0 60T	Storage
试剂(A): CAD Lysis Buffer	80ml	4°C避光
试剂(B): CAD Assay Buffer	10ml	4°C
试剂(C): NADP	1支	-20°C
试剂(D): CAD 终止液(备选)	1ml	RT
使用说明书	1份	

自备材料

- 1、蒸馏水
- 2、研钵或匀浆器、离心管或试管、低温离心机
- 3、水浴锅或恒温箱、96 UV 紫外检测酶标板、全波长酶标仪

操作步骤(仅供参考)

1、准备样品:

①植物样品:取1g植物组织或水果中层果肉置于液氮中迅速研磨或匀浆,加入1ml预冷的CAD Lysis Buffer,4°C 10000r/min离心15~20min,留取上清液,-20°C冻存,用于肉桂醇脱氢酶的检测。

②血浆、血清和尿液样品:血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定,-20°C冻存,用于肉桂醇脱氢酶的检测。

③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如有必要用 CAD Lysis Buffer 进行适当匀浆，4℃ 10000r/min 离心 15~20min，取上清液，-20℃冻存，用于肉桂醇脱氢酶的检测。

④高活性样品：如果样品中含有较高活性的肉桂醇脱氢酶，可以使用 CAD Lysis Buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、配制CAD Assay Buffer工作液：取1支 NADP 完全溶解于 10ml CAD Assay Buffer，即为 CAD Assay Buffer 工作液；4℃保存1周，-20℃保存3个月。

3、CAD加样：取96孔板，按照下表设置对照孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的CAD活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置2平行孔，求平均值。

加入物(μl)	对照孔	测定孔
CAD Lysis Buffer	40	-
待测样品	-	40
CAD Assay Buffer 工作液	160	160

4、CAD检测：以对照孔为对照(调零)，酶标仪立即测定340nm处测定孔的吸光度(记为 $A_{\text{测定}0}$)，37℃准确孵育10min，立即加入10μlCAD终止液终止反应(备选方案)，以对照孔为对照(调零)，酶标仪立即测定340nm处测定孔的吸光度(记为 $A_{\text{测定}1}$)。注意：加入CAD终止液终止反应不是必须步骤，可37℃准确孵育10min后直接以对照孔为对照(调零)，酶标仪立即测定340nm处测定孔的吸光度(记为 $A_{\text{测定}1}$)。建议立即检测，加样时间越短越好，其反应基本在1~5min内，其后反应趋于平缓。

注意：该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，进而推算出NADP的消耗速率，再进一步推算出CAD的量，因此立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。

计算

CAD 活性单位的定义：在该实验条件下，每 1min 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

$$\text{组织样品 CAD(U)} = \{(A_{\text{测定}1} - A_{\text{测定}0}) \times V_T\} / (W \times V_S \times 0.01 \times t)$$

$$\text{液体样品 CAD(U)} = (A_{\text{测定}1} - A_{\text{测定}0}) / (0.01 \times t)$$

式中： $A_{\text{测定}1}$ = 孵育 10min 后测定管的吸光度

$A_{\text{测定}0}$ = 加入 CAD Assay buffer 工作液后立即测定的测定管吸光度

W = 组织样本的重量(g)

V_T = 提取酶液的总体积(ml)

V_S = 测定时所用酶液体积(ml)

t = 反应时间(min) = 10

注意事项

- 1、待测样品中不能含有酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 2、提CAD酶液取时，注意低温操作，防止酶活性，亦可-20℃保存。
- 3、CAD终止液具有一定腐蚀性，请小心操作。
- 4、如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。
- 5、测定时必须选用 96 孔 UV 紫外检测酶标板或石英玻璃板。
- 6、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6 个月。低温运输，按要求保存。