

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

(货号: ADS-W-QT024-48 微板法 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 2.5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1 支	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	4°C保存	临用前加入 7mL 试剂四充分溶解; 用不完的试剂 4°C保存;
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 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:

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

② 试剂放在 37°C 水浴 5min;

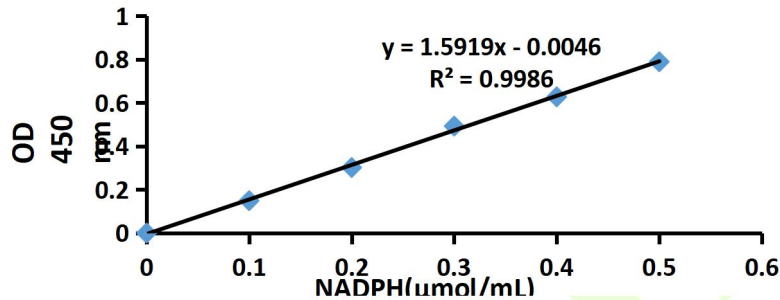
③ 按照下表在 96 孔板中依次加入试剂:

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°C 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  $\Delta A$ 。



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  $1\text{ nmol}$   $\text{NADP}^{+}$  转换成  $1\text{ nmol}$   $\text{NADPH}$  定义为一个酶活力单位。

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

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

3、按样本鲜重计算：

单位的定义：在  $37^{\circ}\text{C}$ ，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  $1\text{ nmol}$   $\text{NADP}^{+}$  转换成  $1\text{ nmol}$   $\text{NADPH}$  定义为一个酶活力单位。

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

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

4、液体样本中 CAD 活力计算：

单位的定义：在  $37^{\circ}\text{C}$ ，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  $1\text{ nmol}$   $\text{NADP}^{+}$  转换成  $1\text{ nmol}$   $\text{NADPH}$  定义为一个酶活力单位。

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

$V$ ---加入提取液体积， $1\text{ mL}$ ；

$V1$ ---加入样本体积， $0.02\text{ mL}$ ；

$T$ ---反应时间， $30\text{ min}$ ；

$W$ ---样本质量， $\text{g}$ 。

$\text{Cpr}$ ---样本蛋白质浓度， $\text{mg/mL}$ ；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 ( $1\mu\text{mol}/\text{ml}$ )：向标准品 EP 管里面加入  $1.2\text{ml}$  蒸馏水。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品： $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据  $20\mu\text{L}$  标准品+ $10\mu\text{L}$  试剂二+ $170\mu\text{L}$  试剂四，混匀后室温  $5\text{min}$  后于  $450\text{nm}$  处读值，根据结果即可制作标准曲线。