



肉桂醇脱氢酶活性检测试剂盒

CAD Assay Kit

微量法

产品编号: AK466M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES466	100mL×1 瓶	4°C保存；
AK466-A	25 mL×1 瓶	4°C保存；
AK466-B	粉剂×2 瓶	-20°C保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD) 是木质素生物合成途径中的关键酶之一，是木质素单体合成反应中的最后一步，催化多种不同的肉桂醛（香豆醛、芥子醛以及松柏醛等）生成与之相应的肉桂醇。该酶多存在于高等植物、酵母、菌类中，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。

原理: CAD 催化肉桂醇和 NADP 生成肉桂醛和 NADPH，在 340nm 下测定 NADPH 生成速率，即可反映 CAD 活性。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理:

- 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个) : ES466 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES466)，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 组织：按照组织质量 (g) : ES466 体积(mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES466)，进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 样本测定
 - 在 AK466-B 中加入 10mL AK466-A 充分溶解混匀，室温使用涡旋振荡仪振荡溶解 15min，如未溶解可适当延长振荡时间；置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min；现配现用 (配好后 24h 内用完)；
 - 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
AK466-B	190
混匀，立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A2-A1。	

CAD 酶活性计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$CAD (\text{U/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$CAD (\text{U/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$CAD (\text{U}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$CAD (\text{U/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$CAD (\text{U/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$CAD (\text{U}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摆尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白

质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。