

肉桂醇脱氢酶（CAD）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1963

产品规格：100T/96S

产品简介：

CAD是木质素生物合成途径中的关键酶之一，催化香豆醛、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。

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



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体120mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1瓶	-20℃
试剂二	液体×1瓶	2-8℃
试剂三	液体25mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制：

1. 提取液：内含不溶物，使用前摇匀。
2. 试剂一：临用前加入5mL试剂三溶解。可溶解后分装-20℃保存，避免反复冻融。
3. 试剂二：液体置于试剂瓶内玻璃管中。临用前加入15mL乙醇充分混匀，配好后2-8℃保存。
4. 工作液的配制：将试剂一、试剂二、试剂三按1:1:2（V:V:V）的比例配制工作液，工作液现用现配。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰、乙醇和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液（加入前摇匀））进行冰浴匀浆，然后10000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
2. 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）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），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）；10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 操作表：在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
样本	-	20
蒸馏水	20	-
工作液	180	180

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于25℃水浴或培养箱5min（酶标仪有控温功能可将温度调至25℃），拿出迅速擦干测定5min10s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管（空白管只需做1-2次）。

三、CAD酶活计算

A、按微量石英比色皿计算：

1. 按蛋白浓度计算

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

$$\text{CAD酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

酶活定义：每g组织每分钟消耗1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAD酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

酶活定义：每10⁴个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAD酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；

V样：反应体系中样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间，5min；500：细菌或细胞总数，500万；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

B、按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

注意事项：

1. 当A1小于0.8，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。
2. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.04。

实验实例：

1. 取约0.1g三叶草叶，加入1mL提取液进行冰浴匀浆，然后10000g，4℃，离心10min，取上清，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测定计算ΔA测定管=A1测定-A2测定=1.7889-1.7045=0.0844，ΔA空白管=A1空白-A2空白=0.9630-0.9433=0.0197，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管=0.0844-0.0197=0.0647，按样本质量计算得：

$$\text{CAD酶活 (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W = 208.0364 \text{ U/g 质量。}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com