

使用说明书

Instruction Manual

肉桂醇脱氢酶活性检测试剂盒（微量法）

CAD Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0041M-ES	100mL×1 瓶	4℃保存
CB0041M-A	25mL×1 瓶	4℃保存
CB0041M-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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、研钵、冰和蒸馏水。

二、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（ 10^4 个）：CB0041M-ES 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0041M-ES），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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 组织：按照组织质量（g）：CB0041M-ES 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0041M-ES），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

三、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 CB0041M-B 中加入 10mL CB0041M-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℃（哺乳动物）或 25℃（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：

Catalog No.CB0041M

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
CB0041M-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 $\Delta A=A2-A1$ 。	

四、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

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。

$$CAD \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 643 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

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

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。

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

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。

$$CAD \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 1286 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

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

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。

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

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 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。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

