

肉桂醇脱氢酶（CAD）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：BC4170

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二	液体×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存

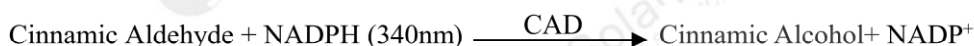
溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀。
- 2、试剂一：临用前加入 15 mL 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 15 mL 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。

产品说明：

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰、乙醇（>98%，AR）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）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清，置冰上待测。

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 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、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。





2、操作表：在1mL石英比色皿中分别加入下列试剂：

试剂名称	空白管	测定管
样本 (μL)	-	100
蒸馏水 (μL)	100	-
工作液 (μL)	900	900

在 1mL 石英比色皿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°C 水浴 5min，拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ （空白管只需做 1-2 次）。

三、CAD酶活计算

1. 按蛋白浓度计算

酶活定义：每mg组织蛋白每分钟消耗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。

$$\text{CAD酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div N$$

ϵ : NADPH摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol /cm; d: 1mL石英比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, 0.001L; V样: 反应体系中样本体积, 0.1mL; 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; N: 细菌或细胞总数, 以万计; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

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°C，离心10min，取上清，按照测定步骤操作，测定计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.532 - 1.462 = 0.07$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 1.012 - 1.007 = 0.005$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.07 - 0.005 = 0.065$ ，按样本质量计算得：
CAD酶活 (U/g 质量) = 321.54×ΔA÷W=209.001 U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Kang L, Wu Y, Jia Y, Chen Z, Kang D, Zhang L, Pan C. Nano-selenium enhances melon resistance to *Podosphaera xanthii* by enhancing the antioxidant capacity and promoting alterations in the polyamine, phenylpropanoid and hormone signaling pathways. J Nanobiotechnology. 2023 Oct 16;21(1):377. doi: 10.1186/s12951-023-02148-y. PMID: 37845678; PMCID: PMC10577987.

[2] Wang C, Chen Y, Chen S, Min Y, Tang Y, Ma X, Li H, Li J, Liu Z. Spraying chitosan on cassava roots reduces postharvest deterioration by promoting wound healing and inducing disease resistance. Carbohydr Polym. 2023 Oct





15;318:121133. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121133. Epub 2023 Jun 19. PMID: 37479443.

[3] Yang J, Song J, Feng Y, Cao Y, Fu B, Zhang Z, Ma N, Li Q, Hu T, Wang Y, Yang P. Osmotic stress-induced lignin synthesis is regulated at multiple levels in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Int J Biol Macromol*. 2023 Aug 15;246:125501. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125501. Epub 2023 Jun 20. PMID: 37348591.

[4] Zhang L, Yu Y, Zhang M, Rong K, Wu Y, Zhang M, Hu H. Genome-wide identification of xylan glucuronosyltransferase family in cotton and function characterization of GhGUX5 in regulating *Verticillium* wilt resistance. *Int J Biol Macromol*. 2023 Aug 1;245:124795. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124795. Epub 2023 May 18. PMID: 37207759.

[5] Gong X, Qi K, Chen J, Zhao L, Xie Z, Yan X, Khanizadeh S, Zhang S, Tao S. Multi-omics analyses reveal stone cell distribution pattern in pear fruit. *Plant J*. 2023 Feb;113(3):626-642. doi: 10.1111/tpj.16073. Epub 2023 Jan 19. PMID: 36546867.

相关系列产品:

BC2030/BC2035 异柠檬酸裂解酶 (ICL) 活性检测检测试剂盒

BC3170/BC3175 乙酸激酶 (ACK) 活性检测试剂盒

