



## 肉桂醇脱氢酶活性检测试剂盒

### CAD Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号：AK466U

产品规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES466	60mL×1 瓶	4℃保存；
AK466-A	60mL×1 瓶	4℃保存；
AK466-B	粉剂×2 瓶	-20℃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、1mL 石英比色皿、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理：

1. 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）：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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 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。
2. 样本测定
  - （1）在 AK466-B 中加入 25mL 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；**现配现用（配好后 24h 内用完）**；
  - （2）在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	50
AK466-B	950
混匀，立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

CAD 酶活性计算公式：

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

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

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。

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

**注：** V 反总：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 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。