

肉桂醇脱氢酶（CAD）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHC7-M48	肉桂醇脱氢酶（CAD）活性检测试剂 盒说明书	48T	微量法
PYHC7-M96		96T	

一、测定意义：

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，其活性直接影响木质素的含量和组成。木质素是植物细胞壁的重要成分，参与植物抗病、抗虫和抗逆（如干旱、盐胁迫）的生理过程。CAD活性与植物生长发育密切相关，尤其是在茎、根等木质化组织的形成过程中。

二、测定原理：

肉桂醇脱氢酶（Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, CAD）是植物木质素生物合成途径中的关键酶，肉桂醇脱氢酶（CAD）催化肉桂醇氧化为肉桂醛，通过监测反应中 NADP^+ 的生成量，在 340 nm 波长下测定吸光度的变化，通过吸光度变化速率计算酶活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂三：用时每瓶粉剂加入试剂一 10mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂三：用时每瓶粉剂加入试剂五 5mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂四	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提3-5分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至340nm。
2. 测定前将试剂恢复至常温；

3. 操作表（在96孔UV板中加入以下试剂）：

	测定管	空管
样品（ μL ）	40	40
试剂一（ μL ）	-	80
试剂二（ μL ）	80	80
试剂三（ μL ）	80	-
37°C 反应 30min		
试剂四（ μL ）	40	40
充分混匀，显色稳定后于 340nm 读数。测定 340nm 处吸光值，别记为 A 空白、A 测定。 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白管只做 1-2 管）		

四、肉桂醇脱氢酶（CAD）酶活性计算：

1、组织样本肉桂醇脱氢酶（CAD）计算

(1) 按样本鲜重计算：

单位定义： 每克组织每分钟生成 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

$$\text{CAD (U/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = \Delta A \times 0.054 \times 10^3 \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义： 每毫克蛋白每分钟生成 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

$$\text{CAD (U/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = \Delta A \times 0.054 \times 10^3 \div C_{\text{pr}}$$

V 反总： 反应体系总体积， $0.24 \times 10^{-3} \text{ L}$ ；

ϵ ： NADPH， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d： 比色皿光径，0.6cm；

V 样： 加入样本体积，0.04mL；

V 样总： 加入提取液体积，1mL；

T： 反应时间，30min；

Cpr： 样本蛋白质浓度，mg/mL；

10^9 ： 单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ；

W： 样本质量，g；

五、 注意事项：

1、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；