肉桂醇脱氢酶(CAD)检测试剂盒(肉桂酸微板法)

产品简介:

肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)是催化香豆醛形成松柏醇的酶。该酶多存在于高等植物、酵母、菌类可溶性部分物质，属于细胞木质素合成途径中间的关键酶，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。

肉桂醇脱氢酶(CAD)检测试剂盒(肉桂酸比色法)检测原理是以肉桂酸、NADP作为底物，在酶促反应的最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法，于酶标仪340nm 处检测吸光度，以吸光度变化所需酶量进行计算，主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的肉桂醇脱氢酶活性，尤其适用于检测水果中肉桂醇脱氢酶活性，60T 可以检测约 57~58 个样品。该产品仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0417 60T	Storage
试剂(A): CAD Lysis Buffer	80ml	4℃ 避光
试剂(B): CAD Assay Buffer	10ml	4℃
试剂(C): NADP	1 支	-20℃
试剂(D): CAD 终止液(备选)	1ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 蒸馏水

2、 研钵或匀浆器、离心管或试管、低温离心机

3、 水浴锅或恒温箱、96 孔 UV 紫外检测酶标板、全波长酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、 准备样品:

①植物样品：取 1g 植物组织或水果中层果肉置于液氮中迅速研磨或匀浆，加入 1ml 预冷的 CAD Lysis Buffer，4℃ 10000r/min 离心 15~20min，留取上清液，-20℃冻存，用于肉桂醇脱氢酶的检测。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，-20℃冻存，用于肉桂醇脱氢酶的检测。

③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如有必要用 CAD Lysis Buffer 进行适当匀浆，4℃ 10000r/min 离心 15~20min，取上清液，-20℃冻存，用于肉桂醇脱氢酶的检测。

④高活性样品：如果样品中含有较高活性的肉桂醇脱氢酶，可以使用 CAD Lysis Buffer 稀释进行恰当的稀释。

2、配制 CAD Assay Buffer 工作液：取 1 支 NADP 完全溶解于 10ml CAD Assay Buffer，即为 CAD Assay Buffer 工作液；4℃保存 1 周，-20℃保存 3 个月。

3、CAD 加样：取 96 孔板，按照下表设置对照孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的 CAD 活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置 2 平行孔，求平均值。

加入物(μl)	对照孔	测定孔
CAD Lysis Buffer	40	—
待测样品	—	40
CAD Assay Buffer 工作液	160	160

4、CAD 检测：以对照孔为对照(调零)，酶标仪立即测定 340nm 处测定孔的吸光度(记为 $A_{测定0}$)，37℃准确孵育 10min，立即加入 10μl CAD 终止液终止反应(备选方案)，以对照孔为对照(调零)，酶标仪立即测定 340nm 处测定孔的吸光度(记为 $A_{测定1}$)。注意：加入 CAD 终止液终止反应不是必须步骤，可 37℃准确孵育 10min 后直接以对照孔为对照(调零)，酶标仪立即测定 340nm 处测定孔的吸光度(记为 $A_{测定1}$)。Leagene 建议立即检测，加样时间越短越好，其反应基本在 1~5min 内，其后反应趋于平缓。

注意：该反应系统是利用速率变化，求得相应 OD 的变化，进而推算出 NADP 的消耗速率，再进一步推算出 CAD 的量，因此立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。

计算：

CAD 活性单位的定义：在该实验条件下，每 1min 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

组织样品 CAD(U)=$\{(A_{测定1}-A_{测定0})\times V_T\}/(W\times V_S\times 0.01\times t)$

液体样品 CAD(U)=$(A_{测定1}-A_{测定0})/(0.01\times t)$

式中：$A_{测定1}$=孵育 10min 后测定管的吸光度

$A_{测定0}$=加入 CAD Assay buffer 工作液后立即测定的测定管吸光度

W=组织样本的重量(g)

V_T=提取酶液的总体积(ml)

V_S=测定时所用酶液体积(ml)

t=反应时间(min)=10

注意事项:

1、 待测样品中不能含有酶抑制剂，同时需避免反复冻融。

2、 提 CAD 酶液取时，注意低温操作，防止酶活性，亦可-20℃保存。

3、 CAD 终止液具有一定腐蚀性，请小心操作。

4、 如果没有全波长酶标仪，也可以使用全波长紫外分光光度计测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。

5、 测定时必须选用 96 孔 UV 紫外检测酶标板或石英玻璃板。

6、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCCC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
GCCM0004	LB 培养基
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)

