

肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

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。

需自备的仪器和用品:

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。

试剂的组成和配制:

提取液: 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 25 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存;

粗酶液提取:

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): 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 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): 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。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) 在试剂二中加入 10mL 试剂一充分溶解混匀,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) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 试剂二,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 活性计算：

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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。