

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0318

Size: 100T/96S

NADP 磷酸酶 (NADPase) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

NADPase 主要存在于植物组织中, 是生物体内唯一催化 NADP^+ 降解为 NAD^+ 的酶, 与 NADK 一起调控 NAD 和 NADP 之间的平衡。

二、测定原理:

NADPase 能够催化 NADP^+ 水解为 NAD^+ 和无机磷的反应, 通过测定无机磷的量来测定 NADPase 活性。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、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

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15 mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 × 4 支	-20℃ 保存	用时加入 1mL 试剂一充分溶解备用, 现配现用
试剂三	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存	用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃ 可保存一周
试剂四	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存	用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃ 可保存一周
试剂五	液体 25mL × 1 瓶	室温保存	
试剂六	10mmol/L 标准磷	4℃ 保存	

	贮备液 10mL×1 瓶		
0.5 μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂六 20 倍稀释，即取 0.5mL 试剂六加 9.5 蒸馏水，充分混匀。			
定磷试剂的配制：按 H2O：试剂三：试剂四：试剂五=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配			

注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

五、样本的前处理：

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。

六、操作步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。

2、酶促反应（在EP管中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂一	120	120
试剂二	40	40
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 5min		
样本	40	
蒸馏水		40

37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应30min后，95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，10000g 25℃离心5min，取上清

3、定磷（在EP管或96孔板中加入下列试剂）

	标准管	空白管	测定管	对照管
0.5 μmol/ml 标准磷应用液	20			
蒸馏水		20		
上清液			20	20
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，25℃室温放置30min，在660nm处，记录各管吸光值。

七、注意事项：

1、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格，要没有一点磷，若试管放过磷酸或磷酸盐缓冲液，一定要洗得非常干净，要先用洗洁精加水煮，再用自来水冲，最后用蒸馏水冲干净。最好用一次性塑料管或新玻璃管，避免磷污染是检测成败的关键。

2、标准管、空白管和对照管只要做一次即可。

八、NADPase 酶活性计算：

1、按组织蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白NADPase分解NADP产生1 μmol 无机磷的量为一个NADPase活力单位。

$$\text{NADPase } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (\text{C标准管} \times \text{V总}) \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div (\text{V样} \times \text{Cpr}) \div \text{T} = 5 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

定义：每小时每g组织NADPase分解NADP产生1 μmol 无机磷的量为一个NADPase活力单位。

$$\text{NADPase } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (\text{C标准管} \times \text{V总}) \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \times \text{V总} \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} = 5 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{W}$$

C标准管：标准管浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ；V总：酶促反应总体积，0.2mL；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，0.5小时；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g。