

NADP 磷酸酶 (NADPase) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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：

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。

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。

所需的仪器和用品：

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

试剂的组成和配制：

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 1 mL 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 标准磷贮备液 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。

0.5μmol/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。

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。

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
0.5μmol/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。

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。

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 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

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

- 2、按样本鲜重计算:

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

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

C 标准管: 标准管浓度, 0.5μmol/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。