



NADP 磷酸酶 (NADPase) 检测试剂盒

NADP Phosphatase Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK274

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES274	60mL×1 瓶	4℃保存
AK274-A	30 mL×1 瓶	4℃保存
AK274-B	粉剂×5 支	-20℃保存; 用时加入 1 mL 试剂 A 充分溶解备用, 现配现用
AK274-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃可保存一周
AK274-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃可保存一周
AK274-E	25mL×1 瓶	室温保存
AK274-标准品	10mL×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

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。

自备用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

样品制备:

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. 分光光度计预热 30min, 调节波长至 660nm。
2. 定磷试剂的配制: 按 H₂O: 试剂 C: 试剂 D: 试剂 E=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。
3. 标准溶液的制备: 将 10 μmol/mL 标准溶液用提取液稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μmol/mL 的标准液待测, 现用现配。
4. 酶促反应 (在 EP 管中加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
试剂 A	300	300
试剂 B	100	100
37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 5min		
样本	100	
蒸馏水		100

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。

5. 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
标准磷应用液	100			
蒸馏水		100		
上清液			100	100
定磷试剂	1000	1000	1000	1000

计算公式：

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度 ΔA 标准（y， ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定（y， ΔA 测定）带入公式计算样本浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2. 酶活计算：

（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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase (U/mg prot)} = (x \times V_{\text{总}}) \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 10x \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算：

定义：每小时每 g 组织 NADPase 分解 NADP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase (U/g 鲜重)} = (x \times V_{\text{总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 10x \div W$$

注： $V_{\text{总}}$ ：酶促反应总体积，0.5mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：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。

注意事项：

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。