



NADP 磷酸酶 (NADPase) 检测试剂盒

NADP Phosphatase Assay Kit

微量法

产品编号: AK275

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES275	100mL×1 瓶	4℃保存
AK275-A	15 mL×1 瓶	4℃保存
AK275-B	粉剂×4 支	-20℃保存; 用时加入 1 mL 试剂 A 充分溶解备用, 现配现用
AK275-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
AK275-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
AK275-E	25mL×1 瓶	室温保存
AK275-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/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、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/酶标仪预热 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	120	120
试剂 B	40	40
37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 5min		
样本	40	
蒸馏水		40

37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确反应 30min 后, 95°C 水浴 5min
(盖紧, 以防止水分散失), 冷却后, 10000g 25°C 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	20			
蒸馏水		20		
上清液			20	20
定磷试剂	200	200	200	200

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, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.04mL; $V_{\text{样总}}$: 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。