

NADP 磷酸酶(NADPase)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-FM036 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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。

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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×6 支	-20℃保存	临用前加入 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	临用前加入 25mL 双蒸水, 溶解后 4℃可保存一周。
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 25mL 双蒸水, 溶解后 4℃可保存一周。
试剂五	液体 25mL×1 瓶	室温保存	
标准品	10mmol/L ×1 瓶	4℃保存	0.5μmol/mL 标准磷应用液配制: 将标准品 20 倍稀释, 即取 0.5mL 标准品加 9.5 蒸馏水, 充分混匀, 4℃保存。
定磷试剂的配制: 按 H ₂ O: 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。			

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.25g), 加入 1mL 提取液, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或用各类常见匀浆器)。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清作为待测液。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

- ② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10⁴): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 打开分光光度计预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 412nm，蒸馏水调零。

② 酶促反应：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂一	300	300
试剂二	100	100
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 5min		
样本	100	
蒸馏水		100
25℃准确反应 20min 后，沸水浴 5min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，10000g 常温离心 5min，取上清。		

③ 定磷

试剂名称（μL）	标准管	空白管	测定管	对照管
0.5μmol/ml 标准磷应用液	100			
蒸馏水		100		
上清液			100	100
定磷试剂	1000		1000	1000
混匀，室温放置 30min，在 660nm 处，蒸馏水调零，记录各管吸光值				

【注】：1.若△A 小于 0.01，则可增加样本质量 W 或细胞数量，则改变后的 W 或细胞数量需带入公式重新计算。

2. 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。

3. 标准管、空白管和对照管只要做一次即可。

五、结果计算：

1、按组织蛋白浓度计算：

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

$$\text{NADPase (U/mg prot)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 标} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样})}{\div T} = \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}}{\div T}$$

2、按样本鲜重计算：

定义：规定每小时每克组织中 NADPase 分解 NADP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase (U/g 鲜重)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 标} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W)}{\div T} = \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W}{\div T}$$

3、按细胞数量计算：

定义：规定每小时每 10⁴ 个细胞中 NADPase 分解 NADP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 标} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500)}{\div T} = \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div 500}{\div T}$$

4、按液体体积计算：

定义：规定每小时每 mL 液体中 NADPase 分解 NADP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase (U/mL)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 标} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总})}{\div T} = \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})}{\div T}$$

W---取样质量, g; C 标准管: 标准管浓度, 0.5 μ mol/mL;
V 样: 加入样本体积, 0.1mL ; V 样总: 加入提取液体积, 1mL;
V 标: 标准液加入体积, 0.1mL; T: 反应时间, 0.5 小时;
Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。
500---细胞数量, 万