

## NADP 磷酸酶(NADPase)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM036 微板法 96 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<sup>+</sup>降解为 NAD<sup>+</sup>的酶, 与 NADK 一起调控 NAD 和 NADP 之间的平衡。

NADPase 能够催化 NADP<sup>+</sup>水解为 NAD<sup>+</sup>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                                                                                                                                                 | 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 | 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 <sub>2</sub> 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。<br>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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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(10<sup>4</sup>): 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 打开酶标仪预热 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                                                            | 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  |
| 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（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）

| 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                     | 20  |     |     |     |
| 蒸馏水                                   |     | 20  |     |     |
| 上清液                                   |     |     | 20  | 20  |
| 定磷试剂                                  | 200 |     | 200 | 200 |
| 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。

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

### 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。

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

### 3、按细胞数量计算：

定义：规定每小时每 10<sup>4</sup> 个细胞中 NADPase 分解 NADP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

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

### 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。

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

W---取样质量, g;                                   C 标准管: 标准管浓度, 0.5 $\mu$ mol/mL;  
V 样: 加入样本体积, 0.04mL;               V 样总: 加入提取液体积, 1mL;  
V 标: 标准液加入体积, 0.04mL;           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