

## NADP 磷酸酶 (NADPase) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1227

产品规格: 100管/48样

### 产品简介:

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。

**注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2支	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂五	液体8mL×1瓶	室温
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

### 溶液的配制:

1. 试剂二: 用时加入1.1mL试剂一充分溶解备用, 现配现用。
2. 试剂三: 用时加入8mL双蒸水, 溶解后4℃可保存一周。
3. 试剂四: 用时加入8mL双蒸水, 溶解后4℃可保存一周。
4. 标准品: 10mmol/L标准磷贮备液。将标准品10倍稀释, 即取1mL标准液加9mL蒸馏水, 充分混匀, 配制成1 μmol/mL标准磷应用液。
5. 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, 定磷试剂根据实验用量现用现配。

**注意: 配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。**

### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、匀浆器/研钵和蒸馏水

### 操作步骤:

#### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献):

组织样品: 称取约0.1g样品, 加提取液1.0 mL充分研磨, 于4℃, 8000g离心10min, 取上清液置冰上待测。

#### 二、测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至660nm, 蒸馏水调零。
2. 操作表: 酶促反应

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
-----------	-----	-----



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂一	120	120
试剂二	40	-
蒸馏水	-	40
37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）预热5min		
样本	40	40

37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）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10min，取上清。

### （2）定磷

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	标准管	空白管	测定管	对照管
0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 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，37°C水浴30min，冷却至室温，吸取200 $\mu\text{L}$ 至微量玻璃比色皿或96孔板中，在660nm处，蒸馏水调零，记录各管吸光值，记为A标准管、A空白管、A测定管、A对照管，并计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。（标准管、空白管只要做1-2次）

### 三、NADPase酶活性计算：

#### 1. 按组织蛋白浓度计算：

定义：规定每分钟每毫克组织蛋白中NADPase分解NADP产生1 $\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个NADPase活力单位。

$$\text{NADPase (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}} \times V_{\text{上清}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T$$

$$= 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

#### 2. 按样本鲜重计算：

定义：规定每分钟每克组织中NADPase分解NADP产生1 $\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个NADPase活力单位。

$$\text{NADPase (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}} \times V_{\text{上清}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T$$

$$= 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

C标准：1 $\mu\text{mol/mL}$ 的磷标准应用液；V上清：定磷试验中上清液体积，0.02mL；Cpr：样品蛋白浓度，mg/mL；V样本：酶促反应中样本体积，0.04mL；V酶促：酶促反应总体积，0.2mL；T：反应时间，20min；V提取：提取液体积，1mL；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。
- 由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com