

NADP 磷酸酶 (NADPase) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC1110

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 20 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 用时加入 1.5 mL 试剂一充分溶解备用, 现配现用。
- 2、试剂三: 用时加入 20 mL 双蒸水, 溶解后 2-8℃可保存一周。
- 3、试剂四: 用时加入 20 mL 双蒸水, 溶解后 2-8℃可保存一周。
- 4、标准品: 10 mmol/L 标准磷贮备液。将标准品 20 倍稀释, 即取 0.5 mL 标准液加 9.5 mL 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准磷应用液。
- 5、定磷试剂的配制: 按 H_2O : 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。

产品说明:

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。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL玻璃比色皿、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)**

组织样本: 称取约0.1g样本, 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
试剂一	300	300
试剂二	100	-
蒸馏水	-	100
37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 预热 5min		
样本	100	100

37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确反应 20min 后，沸水浴 5min (缠封口膜，防止爆盖)，冷却后，10000g 常温离心 10min，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	1000

混匀，37°C 水浴 30min，冷却至室温，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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。(空白管和标准管只要做 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 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

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

$$= 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算：

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

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

$$= 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

C 标准：0.5μmol/mL 的磷标准应用液；V 上清：定磷试验中上清液体积，0.1mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；

V 样本：酶促反应中样本体积，0.1mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.5mL；T：反应时间，20min；V 提取：提取液体积，1mL；W：样本质量，g。

注意事项：

- 1、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。
- 2、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。



实验实例：

- 1、取 0.1 肝加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.410 - 0.385 = 0.025$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.365 - 0.005 = 0.360$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{NADPase (U/g 质量)} = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.125 \times 0.025 \div 0.360 \div 0.1 = 0.087 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1g 狗尾巴草（块根）加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.510 - 0.107 = 0.403$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.365 - 0.005 = 0.360$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{NADPase (U/g 质量)} = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.125 \times 0.403 \div 0.360 \div 0.1 = 1.399 \text{ U/g 质量}$ 。

参考文献：

[1] Kawai S, Mori S, Mukai T, et al. Cytosolic NADP phosphatases I and II from *Arthrobacter* sp. strain KM: implication in regulation of $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ balance[J]. Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms, 2004, 44(3): 185-196.

相关系列产品：

- BC0260/BC0265 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）活性检测试剂盒
- BC0400/BC0405 胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）活性检测试剂盒
- BC2100/BC2105 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGDH）活性检测试剂盒

