

## NADP 磷酸酶 (NADPase) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

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。

### 组成：

产品名称	AE011-50T/48S	Storage
提取液：	60ml	4°C
试剂一：液体	30ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶×5	-20°C
试剂三：粉剂	1 瓶	4°C
试剂四：粉剂	1 瓶	4°C
试剂五：液体	25ml	RT
试剂六：10mmol/L 标准磷贮备液	10ml	4°C
说明书	一份	

试剂二：粉剂×5 支，-20°C 保存；用时每支加入 1 ml 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20°C 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，4°C 保存。用时加入 25ml 蒸馏水，溶解后 4°C 可保存一周。

试剂四：粉剂×1 瓶，4°C 保存。用时加入 25ml 蒸馏水，溶解后 4°C 可保存一周。

试剂六：10mmol/L 标准磷贮备液 10ml×1 瓶，4°C 保存。

0.5μmol/ml 标准磷应用液配制：将试剂六 20 倍稀释，即取 0.5ml 试剂六加 9.5 蒸馏水，充分混匀。

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。

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。

### 自备仪器和用品：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

### 样本的前处理：

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、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

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确反应 30min 后，95℃ 水浴 5min (盖紧，以防止水分散失)，冷却后，10000g 25℃ 离心 5min，取上清

#### 2、定磷

	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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 30min，冷却至室温，在 660nm 处，蒸馏水调零，记录各管吸光值。

### 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、标准管、空白管和对照管只要做一次即可。

### NADPase 酶活性计算：

#### 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 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = \frac{(C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T} = 5 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div C_{\text{pr}}$$

#### 2、按样本鲜重计算：

定义：每小时每 g 组织 NADPase 分解 NADP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



---

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

C 标准管：标准管浓度，0.5 $\mu\text{mol/ml}$ ；V 总：酶促反应总体积，0.5ml；V 样：加入样本体积，0.1ml；V 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。

