

NADP 磷酸酶（NADPase）活性检测试剂盒

（可见分光光度法）

产品货号：BA1226

产品规格：50管/24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30mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×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20mL×1瓶	室温
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

溶液的配制：

- 试剂二：用时加入1.5mL试剂一充分溶解备用，现配现用。
- 试剂三：用时加入20mL双蒸水，溶解后4℃可保存一周。
- 试剂四：用时加入20mL双蒸水，溶解后4℃可保存一周。
- 标准品：10mmol/L标准磷贮备液。将标准品20倍稀释，即取0.5mL标准液加9.5mL蒸馏水，充分混匀，配制成0.5 μmol/mL标准磷应用液。
- 定磷试剂的配制：按H₂O₂：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、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：

- 分光光度计预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热5min		
样本	100	100

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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。

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℃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 ΔA 标准 = A标准管-A空白管, ΔA 测定=A测定管-A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。

$$\begin{aligned} \text{NADPase (U/mg prot)} &= \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{标准} \times V \text{上清} \div (C \text{pr} \times V \text{样本} \times V \text{上清} \div V \text{酶促}) \div T \\ &= 0.125 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{pr} \end{aligned}$$

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1μmol无机磷的量为一个NADPase活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADPase (U/g 鲜重)} &= \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{标准} \times V \text{上清} \div (W \times V \text{样本} \div V \text{提取} \times V \text{上清} \div V \text{酶促}) \div T \\ &= 0.125 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div W \end{aligned}$$

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; Cpr: 样品蛋白浓度, 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

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>