

## NADP 磷酸酶 (NADPase)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0895F 分光法 24 样)

### 一、产品简介:

NADP 磷酸酶 (NADPase)主要存在于植物组织中的一种水解酶,与 NADK 一起调控 NAD<sup>+</sup>和 NADP<sup>+</sup>之间的平衡。该酶能够催化 NADP<sup>+</sup>(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)的水解反应,去除其 2'-磷酸基团,生成 NAD<sup>+</sup>(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和无机磷酸(Pi)。本试剂盒通过测定无机磷的量来测定 NADPase 活性。

### 二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部,再加 0.7mL 蒸馏水,混匀溶解备用。
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4°C保存	临用前向每瓶 A 试剂中加入 2.9mL 的 B 液,再加 37.1mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

【注】: 全程操作需无磷环境;试剂配置用新枪头和玻璃移液器等,也可用一次性塑料器皿,避免磷污染。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

### 四、NADP 磷酸酶 (NADPase)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C离心 15min,取上清,置冰上待测。

【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 的比例提取

② 细胞样本: 先收集细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细胞加入 1mL 提取液;超声波破碎细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);4°C 约 12,000rpm 离心 10min,取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量,可按照细菌/细胞数量( $10^4$ ): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 700nm,蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温或放在 37°C水浴 5-10 min;在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
试剂一	280	300
样本	150	150
试剂二	20	
混匀, 37°C 孵育 30min		

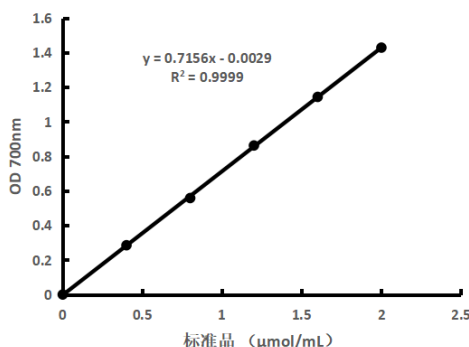
试剂三	60	60
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测。		

④ 显色反应, 在 EP 管中依次加入:

上清液	150	150
试剂四	600	600
混匀, 室温静置 3min (若仍浑浊, 可 5000rpm 离心 5min), 取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中, 于 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个样本做一个自身对照)。		

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.7156x - 0.0029$ ,  $x$  是标准品摩尔浓度( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  是  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白分解  $\text{NADP}^+$  产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\mu\text{mol/h/mg prot}$ ) =  $[(\Delta A + 0.0029) \div 0.7156 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 9.5 \times (\Delta A + 0.0029) \div Cpr$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解  $\text{NADP}^+$  产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\mu\text{mol/h/g 鲜重}$ ) =  $[(\Delta A + 0.0029) \div 0.7156 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 9.5 \times (\Delta A + 0.0029) \div W$

4、按细菌或细胞密度计算:

定义: 每小时每 1 万个细菌或细胞分解  $\text{NADP}^+$  产生  $1\text{nmol}$  无机磷量为一个酶活力单位。

酶活力( $\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}$ ) =  $[(\Delta A + 0.0029) \div 0.7156 \times V2] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T$   
 $= 19 \times (\Delta A + 0.0029)$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.15mL; V2---酶促反应总体积, 0.51mL;

T---反应时间, 1/2 小时; W---样本鲜重, g; 500---细菌或细胞总数, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 制备标准品母液( $50\mu\text{mol/mL}$ ): 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。