

NADP 磷酸酶 (NADPase) 检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 15 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×4 支，-20℃ 保存；用时加入 1 mL 试剂一充分溶解备用，现配现用。

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

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

试剂五：液体 25mL×1 瓶，室温保存。

试剂六：10mmol/L 标准磷贮备液 10mL×1 瓶，4℃ 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 H₂O: 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。

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零。

2、酶促反应 (在 EP 管中加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	120	120
试剂二	40	40

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 5min

样本	40	
蒸馏水		40

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

3、定磷（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）

	标准管	空白管	测定管	对照管
0.5μmol/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，25℃室温放置 30min，在 660nm 处，记录各管吸光值。

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。

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

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。

$$\begin{aligned} \text{NADPase } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \\ & \text{样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/mL；

V 总：酶促反应总体积，0.2mL；

V 样：加入样本体积，0.04mL；

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。

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。

