

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:

1. 试剂二: 用时加入1.5mL试剂一充分溶解备用, 现配现用。
2. 试剂三: 用时加入20mL双蒸水, 溶解后4℃可保存一周。
3. 试剂四: 用时加入20mL双蒸水, 溶解后4℃可保存一周。
4. 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, 配制成为0.5 μmol/mL标准磷应用液。
5. 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:

1. 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

上海尚宝生物科技有限公司
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°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 (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°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。

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

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

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。

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

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

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

上海尚宝生物科技有限公司
 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