

NADP 磷酸酶 (NADPase) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成和配制:

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。

操作步骤:

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
0.5 μ mol/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 $^{\circ}$ C 室温放置 30min，在 660nm 处，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 1 μ mol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

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

- 2、按样本鲜重计算：

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

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

C 标准管：标准管浓度，0.5 μ mol/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；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g。