

# NADP 磷酸酶 (NADPase) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1012

保存: -20°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织

## 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<sup>+</sup> 降解为 NAD<sup>+</sup> 的酶, 与 NADK 一起调控 NAD 和 NADP 之间的平衡。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 NADPase 的活性水平。其原理是 NADPase 能够催化 NADP<sup>+</sup> 水解为 NAD<sup>+</sup> 和无机磷的反应, 通过测定无机磷的量来测定 NADPase 活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4°C
试剂一	7.5mL	15mL	4°C
试剂二	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20°C 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存
试剂六	5mL	10mL	室温保存
标准品 (10mM 标准磷贮备液)	1mL	1mL	4°C 避光保存

## 自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计 (能测 660nm 处的吸光度) 及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器

## 试剂准备

提取液: 即用型; 4°C 保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 临用前每支加入 1 mL 试剂一充分溶解备用, 现配现用。

试剂三: 临用前配制, 48T 加入 2mL 去离子水充分溶解, 96T 加入 4mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂四: 临用前配制, 48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解, 96T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂五: 临用前配制, 48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解, 96 T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂六: 即用型; 室温保存。

定磷剂的配制: 按 H<sub>2</sub>O: 试剂四: 试剂五: 试剂六=2:1:1:1 的比例配制, 配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染, 定磷剂现配现用。

## 产品说明书

**注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。**

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	100μL 10mM	900	1
Std. 2	100μL of Std. 1 (1mM)	100	0.5
Std. 3	100μL of Std. 2 (0.5mM)	100	0.25
Std. 4	100μL of Std. 3 (0.25mM)	100	0.125
Std. 5	100μL of Std. 4 (0.125mM)	100	0.0625
Std. 6	100μL of Std. 5 (0.0625mM)	100	0.0313
Std. 7	100μL of Std. 6 (0.0313mM)	100	0.0156

**注意：每次实验，请使用新配制的标准品。**

### 样本制备

组织样本：按 0.1g 组织加入 1mL 的提取液的比例进行冰浴匀浆。匀浆液于 4℃，8,000g 离心 10 min。取上清，置于冰上待测。

**注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。处理好的样本须当天检测。**

**如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。**

### 实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 660nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
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	0
去离子水	0	40

37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 30min

试剂三	20	20
-----	----	----

混匀后，室温（25℃），4,000g，离心 10min，取上清液；

3. 定磷（96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)
上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
定磷剂	200	200	200	200

## 产品说明书

混匀，25℃静置10min，在660nm处，记录各管吸光值A，分别记为A<sub>空白</sub>、A<sub>标准</sub>、A<sub>对照</sub>、A<sub>测定</sub>。计算 $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

**注意：**标准孔、空白孔和对照孔各做1个即可。实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果计算 $\Delta A_{测}$ 小于0.001可适当加大样本量；如果 $\Delta A_{测}$ 大于1.5或测定孔有明显浑浊，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

### 结果计算

#### 1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为y轴， $\Delta A_{标}$ 为x轴，绘制标准曲线（浓度为y轴更方便计算结果）。

#### 2. 无机磷（Pi）含量的计算

将 $\Delta A_{测}$ 带入方程得到y值（mM=μmol/mL）。

#### 3. NADPase 酶活性计算：活性计算

##### （1）按样本鲜重计算

单位的定义：每小时每g组织中NADPase分解NADP产生1μmol无机磷的量为一个NADPase活力单位U。

$$\text{NADPase (U/g 鲜重)} = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 10 \times y \div W$$

##### （2）按组织蛋白浓度计算：

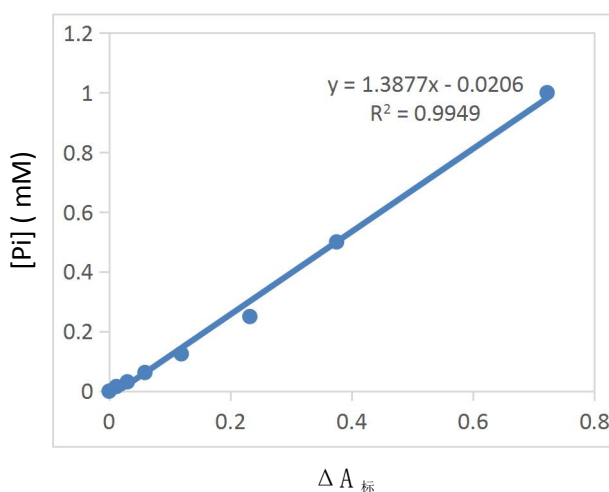
定义：每小时每mg组织蛋白中NADPase分解NADP产生1μmol无机磷的量为一个NADPase活力单位U。

$$\text{NADPase (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 10 \times y \div C_{\text{pr}}$$

$V_{\text{反应}}$ ：酶促反应总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.04mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，0.5小时；W：样本鲜重，g； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL。

### 结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

- PMK1011 辅酶II NADP(H)检测试剂盒（微量法）
- PMK1015 NADP 苹果酸酶（NADP-ME）检测试剂盒（微量法）
- PMK1124 NADPH 氧化酶（NAO）检测试剂盒（微量法）
- PMK1003 NADP-苹果酸脱氢酶（NADP-MDH）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

