



## 辅酶II NADP(H)含量检测试剂盒(WST 显色法)

中文名称 : [辅酶II NADP\(H\)含量检测试剂盒\(WST 显色法\)](#)

英文名称 : Coenzyme I NAD(H) Content Assay Kit (WST colorimetry)

产品包装 : 盒装

产品规格 : 100T/48S

储存条件 : -20℃

检测方法 : 微量法

有效期 : 6个月

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
碱性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四 A	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四 B	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
NADP 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存
NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存



### 溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 4mL 蒸馏水充分混匀, 溶解后 2-8°C 保存 4 周。
- 2、试剂四: 临用前将试剂四 A 溶解到试剂四 B 中, 分装保存, 避免反复冻融, -20°C 保存 4 周。
- 3、NADP 标准品: 临用前加入 1.27mL 蒸馏水, 即 5 $\mu$ mol/mL, -20°C 可以保存 2 周。
- 4、NADPH 标准品: 临用前加入 1.2 mL 蒸馏水, 即 5  $\mu$ mol/mL, -20°C 可以保存 2 周。

### 产品说明:

辅酶 II NADP(H) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, NADP<sup>+</sup> 和 NADPH 含量测定可以计算 NADP (NADPH + NADP<sup>+</sup>) 含量和 NADPH/NADP<sup>+</sup> 比值, 其变化与磷酸戊糖途径和生物合成以及抗氧化反应密切相关。NADPH/NADP<sup>+</sup> 比值不仅是细胞氧化还原态的主要标志之一, 而且在 PPP 途径、生物合成和抗氧化代谢中具有重要调控作用。

分别用酸性和碱性提取液提取样品中 NADP<sup>+</sup> 和 NADPH。在 1-mPMS 作用下, WST-1 可与 NADPH 反应, 产生水溶性 formazan, 在 450nm 下有特征吸收峰, 而 NADP<sup>+</sup> 可被 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原为 NADPH, 进一步采用 WST-1 检测。



**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。



### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、超声破碎仪, 可调式移液器、微量玻璃比色皿 /96 孔板、冰和蒸馏水。

### 操作步骤:

#### 一、样本处理(可适当调整待测样本量)

##### 1、血清(浆)中 NADP<sup>+</sup>和 NADPH 的提取:

NADP<sup>+</sup>的提取: 取血清(浆)体积(mL): 酸性提取液体积(mL)为 1:5- 10 的比例, (建议取 0.1mL 血清(血浆), 加入 0.5 mL 酸性提取液), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g , 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

NADPH 的提取: 取血清(浆)体积(mL): 碱性提取液体积(mL)为 1:5- 10 的比例, (建议取 0.1mL 血清(血浆), 加入 0.5 mL 碱性提取液), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g , 4°C 离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

##### 2、组织中 NADP<sup>+</sup>和 NADPH 的提取:

NADP<sup>+</sup> 的提取: 建议取 0.1g 组织质量, 加入 0.5mL 酸性提取液, 冰浴研磨, 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g , 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

NADPH 的提取: 建议取 0.1g 组织质量, 加入 0.5 mL 碱性提取液, 冰浴研磨, 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g , 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

##### 3、细胞或细菌中 NADP<sup>+</sup>和 NADPH 的提取:



NADP<sup>+</sup>的提取: 先收集细胞或细菌到离心管内, 离心弃上清, 建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 酸性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 停 10s, 重复 30 次), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失), 冰浴冷却后, 10000g, 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

NADPH 的提取: 建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 碱性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 停 10s, 重复 30 次), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g, 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

## 二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。
- 2、NADP<sup>+</sup>标准品: 用蒸馏水稀释为 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0nmol/mL 的标准溶液(0nmol/mL 即空白管)。
- 3、NADPH 标准品: 用蒸馏水稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0nmol/mL 的标准溶液(0nmol/mL 即空白管)。
- 4、稀释表(附于说明书最后)
- 5、在 EP 管中按顺序加入下列试剂:

试剂名称(μL)	对照管(A1、A1')	测定管(A2、A2')	标准管
样品/标准品	20	20	20
试剂一	200	-	-
试剂一	80	80	80
试剂二	30	30	30
试剂三	30	30	30



试剂四	30	30	30
充分混匀, 室温避光静置 1h			
试剂五	-	200	200

混匀, 取 200 $\mu$ L 至微量玻璃皿或 96 孔板中, 读取吸光值, NADP<sup>+</sup> 的记为:  $\Delta A \text{ NADP}^+ = A_2 - A_1$ , NADPH 的记为  $\Delta A \text{ NADPH} = A_2' - A_1'$ , NADP 标准管的记为  $\Delta A \text{ NADP 标} = A \text{ 标} - A \text{ 空白管}$ 。NADPH 标准管的记为  $\Delta A \text{ NADPH 标} = A \text{ 标}' - A \text{ 空白管}$ 。(标准曲线只需做 1-2 次, 每个测定管需设一个对照管)。

### 三、NADP<sup>+</sup>和 NADPH 含量计算

#### 1.标准曲线绘制:

(1) NADP<sup>+</sup>标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度( $x_1$ , nmol/mL)和吸光度 $\Delta A$  标准( $y_1$ ,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A$  测定代入方程得到  $x_1$ (nmol/mL)。

(2) NADPH 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度( $x_2$ , nmol/mL)和吸光度 $\Delta A$  标准( $y_2$ ,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A'$  代入方程得到  $x_2$ (nmol/mL)。

#### 2.NADP<sup>+</sup>和 NADPH 含量计算

(一)NADP<sup>+</sup>含量计算

(1) 按液体体积计算:  $\text{NADP}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = x_1 \times (V \text{ 提取} + V \text{ 血清}) \div V \text{ 血清} = 11 \times x_1$

(2) 按样本蛋白浓度计算  $\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = x_1 \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times \text{Cpr}) = x_1 \div \text{Cpr}$

(3) 按样本鲜重计算  $\text{NADP}^+ \text{含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \times V \text{ 提取} \div W = x_1 \div W$

(4) 按细胞数量计算:  $\text{NADP}^+ \text{含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_1 \times V \text{ 提取} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADPH 含量计算



(1) 按液体体积计算:  $\text{NADPH 含量}(\text{nmol}/\text{mL}) = x_2 \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x_2$

(2) 按样本蛋白浓度计算  $\text{NADPH}(\text{nmol}/\text{mg prot}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) = x_2 \div \text{Cpr}$

(3) 按样本鲜重计算  $\text{NADPH 含量}(\text{nmol}/\text{g 质量}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div W = x_2 \div W$

(4) 按细胞数量计算:  $\text{NADPH 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_2$

V 提取: 加入提取液体积, 1mL; V 血清: 血清(浆)体积, 0.1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

#### 注意事项:

- 1、如果一次性测定样本数较多, 可将试剂一、二、三按比例配成混合液。
  - 2、反应过程中注意避光。
  - 3、由于每一个测定管需要设一个对照管, 本试剂盒 100 管可以测定 48 个 NADP<sup>+</sup> 或 NADPH。
  - 4、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
- 同步修改计算公式。

#### 实验实例:

1. NADP<sup>+</sup>的测定: 称取 0.1g 冬青叶片, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.075 - 0.069 = 0.006$ , 标准曲线  $y_1 = 0.2081x - 0.0144$ , 根据标曲得出  $x_1 = 0.098$ , NADP<sup>+</sup>含量得:

$\text{NADP}^+(\text{nmol}/\text{g 质量}) = x_1 \div W = 0.98 \text{ nmol}/\text{g 质量}$ 。

NADPH 的测定: 称取 0.1g 冬青叶片, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.155 - 0.110 = 0.045$ , 标准曲线  $y_2 = 0.0478x - 0.0188$ , 根据标曲得出  $x_2 = 1.335$ , NADPH 含量得:  $\text{NADPH}(\text{nmol}/\text{g 质量}) = x_2 \div W = 13.35 \text{ nmol}/\text{g 质量}$ 。



2. NADP<sup>+</sup>的测定: 称取 0.1g 小鼠肝脏, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A$  测

定= $A$  测定- $A$  对照=0.194-0.146=0.048, 标准曲线  $y_1=0.2081x-0.0144$ ,根据标曲得出  $x_1=0.3$  , NADP<sup>+</sup>含量得:

NADP<sup>+</sup> (nmol/g 质量)=  $x_1 \div W=2.999$ nmol/g 质量。

NADPH 的测定: 称取 0.1g 小鼠肝脏, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A$  测

测定= $A$  测定- $A$  对照=0.170-0.141=0.029, 标准曲线  $y_2=0.0478x-0.0188$ ,根据标曲得出  $x_2=1$  , NADPH 含量得: NADPH (nmol/g 质量) =  $x_2 \div W=10$  nmol/g 质量。

3. NADP<sup>+</sup> 的测定: 取 0.1mL 牛血清, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算  $\Delta A$  测定= $A$  测定- $A$  对照 =0.077-0.067=0.010 , 标准曲线  $y_1=0.2081x-0.0144$ ,根据标曲得出  $x_1=0.117$  , NADP<sup>+</sup>含量得:

NADP<sup>+</sup> (nmol/mL)=  $11 \times x_1=1.29$ nmol/mL。

NADPH 的测定: 取 0.1mL 牛血清, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A$  测

定= $A$  测定- $A$  对照=0.084-0.072=0.012, 标准曲线  $y_2=0.0478x-0.0188$ ,根据标曲得出  $x_2=0.644$  , NADPH 含量得: NADPH (nmol/mL)=  $11 \times x_2=7.088$ nmol/mL。

#### 标准溶液稀释表:

#### NADP<sup>+</sup>标准品稀释表

序号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积( $\mu$ L)	蒸馏水体积( $\mu$ L)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	5000	10	990	50
2	50	100	900	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25



5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125
7	0.3125	200	200	0.15625
8	0	0	200	0

### NADPH 标准品稀释表

序号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积( $\mu$ L)	蒸馏水体积( $\mu$ L)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	5000	10	990	50
2	50	100	400	10
3	10	200	200	5
4	5	200	200	2.5
5	2.5	200	200	1.25
6	1.25	200	200	0.625
7	0.625	200	200	0.3125
8	0.3125	200	200	0.156
9	0	0	200	0.039