



## 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 : 50T/24S

储存条件 : -20°C

检测方法 : 可见分光光度法

有效期 : 6个月

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂酸性提取液	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
碱性提取液	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四 A	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂四 B	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 70 mL×1 瓶	2-8°C保存
NADP 标准品	粉剂×1 支	-20°C保存
NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20°C保存



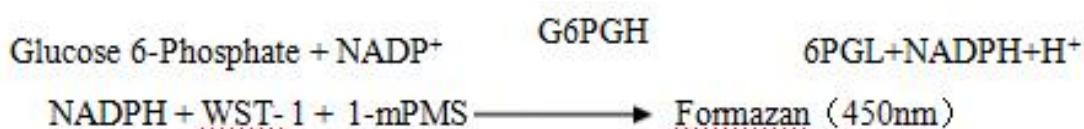
### 溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 12mL 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 1.27 mL 蒸馏水, 即 5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , -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  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , -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。NADPH 通过 PMS 的递氢作用, 使氧化型噻唑蓝(MTT)还原为甲瓩, 570nm 下检测吸光值, 从而测定 NADPH 含量。利用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原 NADP<sup>+</sup> 为 NADPH, 从而检测 NADP<sup>+</sup> 含量。



**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、低温离心机、水浴锅, 研钵/匀浆器、超声破碎仪, 可调式移液器、1mL



玻璃比色皿、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 200 μL 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 0min; 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
- 2、NADP<sup>+</sup> 标准品: 用蒸馏水稀释为 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.01、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 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、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	100	100	100
试剂一	1000	-	-
试剂一	400	400	400
试剂二	150	150	150
试剂三	150	150	150
试剂四	150	150	150
充分混匀, 室温避光静置 1h			
试剂五	-	1000	1000



混匀, 450nm 下比色, 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 $\Delta A_{\text{标准}}$ ( $y_1$ ,  $\Delta A_{\text{标准}}$ ), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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 $\Delta A_{\text{标准}}$ ( $y_2$ ,  $\Delta A_{\text{标准}}$ ), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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  $\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) = x_1 \div$

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:  $\text{NADPH 含量}(\text{nmol/mL}) = x_2 \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x_2$

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



Cpr

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

(4) 按细胞数量计算: NADPH 含量(nmol/ $10^4$ 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 50 管可以测定 24 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, 玻璃比色皿测得吸光值后计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.052 - 0.036 = 0.016$ , 标准曲线  $y_1 = 0.333x - 0.0063$ , 根据标曲得出  $x_1 = 0.067$ , NADP<sup>+</sup>含量得:

NADP<sup>+</sup> (nmol/g 质量) =  $x_1 \div W = 0.67$  nmol/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, 玻璃比色皿测得吸光值后计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.153 - 0.096 = 0.057$ , 标准曲线  $y_2 = 0.0914x - 0.0065$ , 根据标曲得出  $x_2 = 0.695$ , NADPH 含量得: NADPH (nmol/g 质量) =  $x_2 \div W = 6.947$  nmol/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, 玻璃比色皿



测得吸光值后计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.042 - 0.028 = 0.014 , 标准曲线  $y_1 = 0.333x - 0.0063$ , 根据标曲得出  $x_1 = 0.061$  , NADP<sup>+</sup> 含量得: NADP<sup>+</sup> (nmol/g 质量) =  $x_1 \div W = 0.61 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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, 玻璃比色皿测得吸光值后计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.19 - 0.063 = 0.127 标准曲线  $y_2 = 0.0914x - 0.0065$ , 根据标曲得出  $x_2 = 1.461$ , NADPH 含量得: NADPH (nmol/g 质量) =  $x_2 \div W = 14.61 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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, 玻璃比色皿测得吸光值后计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.048 - 0.030 = 0.018 , 标准曲线  $y_1 = 0.333x - 0.0063$ , 根据标曲得出  $x_1 = 0.073$  , NADP<sup>+</sup> 含量得: NADP<sup>+</sup> (nmol/mL) =  $11 \times x_1 = 0.803 \text{ nmol/mL}$ 。

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, 玻璃比色皿测得吸光值后计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - 对照 = 0.056 - 0.032 = 0.024 , 标准曲线  $y_2 = 0.0914x - 0.0065$ , 根据标曲得出  $x_2 = 0.334$  , NADPH 含量得: NADPH (nmol/mL) =  $11 \times x_2 = 3.671 \text{ nmol/mL}$ 。

#### 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( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度(nmol/mL)
1	5000	10	990	50
2	50	50	950	2.5
3	2.5	200	200	1.25
4	1.25	200	200	0.625
5	0.625	200	200	0.3125
6	0.3125	200	200	0.15625
7	0.15625	200	200	0.078



8	0.078	200	200	0.039
9	0.039	200	200	0.0195
10	0.0195	200	200	0.01
11	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	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	0.15625	200	200	0.078
9	0.078	200	200	0.039
10	0	0	200	0