

## 辅酶 II NADP(H)含量检测试剂盒说明书 (WST 显色法)

微量法

货号: BC5205

规格: 100T/48S

**产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
碱性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 4mL×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 25 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

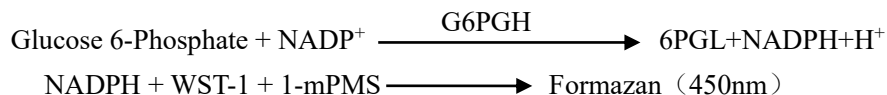
溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 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 1.27 mL 蒸馏水, 即 5 μmol/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 μmol/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，具体比例可以参考文献）

### 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℃ 离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃ 离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,冰上待测。

**NADPH 的提取：**建议取 0.1 g 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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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（A <sub>1</sub> 、A <sub>1</sub> '）	测定管（A <sub>2</sub> 、A <sub>2</sub> '）	标准管
样品/标准品	20	20	20
试剂五	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： $\text{NADP}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = x_1 \times (\text{V 提取} + \text{V 血清}) \div \text{V 血清} = 11 \times x_1$

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

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

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

##### (二) NADPH 含量计算

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

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

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

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

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. 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  $y_1 = 0.2081x - 0.0144$ ，根据标准曲线得出  $x_1 = 0.098$ ，NADP<sup>+</sup>含量得：  
 $\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div \text{W} = 0.98 \text{ nmol/g 质量}$ 。

**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, 96 孔板测得吸光值后计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 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:  $NADPH (\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 13.35 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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, 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:

$$NADP^+ (\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div W = 2.999 \text{ nmol/g 质量}。$$

**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, 96 孔板测得吸光值后计算  $\Delta A$  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:

$$NADPH (\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 10 \text{ nmol/g 质量}。$$

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, 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:

$$NADP^+ (\text{nmol/mL}) = 11 \times x_1 = 1.29 \text{ nmol/mL}。$$

**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, 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:

$$NADPH (\text{nmol/mL}) = 11 \times x_2 = 7.088 \text{ nmol/mL}。$$

### 相关系列产品:

BC1100/BC1105 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (MTT 显色法)

BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒

BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒

BC0310/BC0315 辅酶 I NAD (H) 含量检测试剂盒 (WST-1 显色法)

BC5200/BC5205 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (WST-1 显色法)

### 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 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	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 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	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	0.15625
9	0	0	200	0