

辅酶2 NADP(H)含量(WST-8法)检测试剂盒说明书

规格：微量法 48样

检测波长：450nm

编号：JLC_K14814

检测原理：WST-8法

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

辅酶Ⅱ NADP(H)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，NADP⁺和 NADPH 含量测定可以计算 NADP⁺ (NADPH + NADP⁺)含量和 NADPH/NADP⁺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⁺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。

测定原理

辅酶Ⅱ NADP(H)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，NADP⁺和 NADPH含量测定可以计算 NADP⁺ (NADPH+ NADP⁺)含量和 NADPH/NADP⁺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⁺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。

需自备的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂组成和配制

酸性提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

碱性提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

NADPH提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体10 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃避光保存，用时加入1.5mL水混匀，分装冻存避免反复冻融；

试剂三：液体1.5mL×1瓶，-20℃避光保存；

试剂四：液体1mL×1瓶，-20℃避光保存；

标准品A：粉剂×1支，-20℃避光保存。

标准品B：粉剂×1支，-20℃避光保存。

NADP⁺和NADPH的提取

1、血清（浆）中NADP⁺和NADPH的提取：

NADP⁺的提取：按照血清（浆）体积（mL）：酸性提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.1mL血清（浆），加入1mL酸性提取液），95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

NADPH的提取：按照血清（浆）体积（mL）：NADPH提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.05mL血清（浆），加入1mLNADH碱性提取液），充分震荡，60℃水浴30min（盖紧，以防止水分散失）；10000g 4℃离心10min；取上清，置冰上待测。

2、组织中NADP⁺和NADPH的提取：

NADP⁺的提取：按照组织质量（g）：酸性提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.1g组织，加入1mL酸性提取液），冰浴研磨，95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

NADPH的提取：按照组织质量（g）：NADPH提取液体积（mL）为1：5~20的比例（建议取约0.05g组织，加入1mLNADH提取液），冰浴研磨，60℃水浴30min（盖紧，以防止水分散失）；10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

3、细胞或细菌中NADP⁺和NADPH的提取：

NADP⁺的提取：先收集细胞或细菌到离心管内，弃上清，按照细菌或细胞数量（10⁴个）：酸性提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL酸性提取液），超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次），95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、NADPH的提取：先收集细胞或细菌到离心管内，弃上清，按照细菌或细胞数量（10⁴个）：NADPH提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mLNADPH提取液），超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次），60℃水浴30min（盖紧，以防止水分散失）；12000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、酶标仪预热30min以上，调节波长至450nm。

2、工作液的配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液。

试剂名称（μL）	工作液
试剂一	100
试剂二	50

试剂三	10
-----	----

3、样本测定

按下表在96孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
测定工作液	150

充分混匀，于450nm下测定吸光值A1，37°C避光孵育30min，450nm下测定吸光值A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

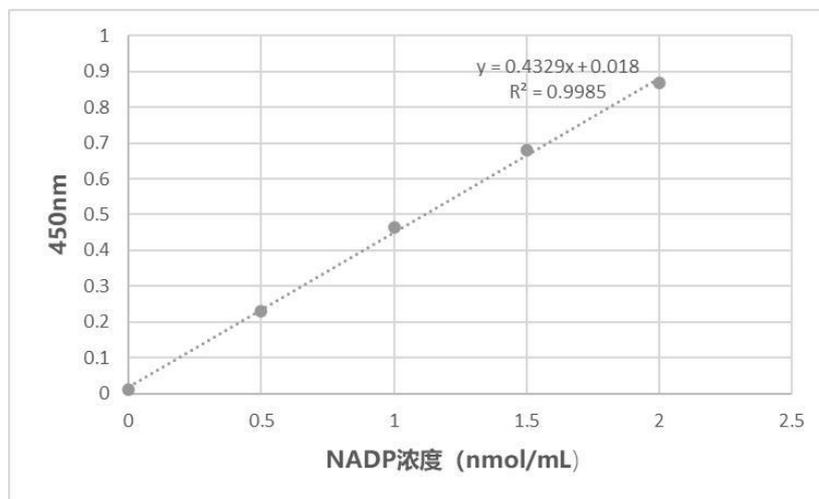
注意事项

若 ΔA 过小可增加样本量或减少提取液体积，公式中的W或V应相应改变。

NADP⁺和NADPH含量的计算

(一) NADP⁺含量的计算：

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.4329x + 0.018$ ， $R^2 = 0.9985$ ； x 为NADP (nmol/mL)， y 为 ΔA 。



1、血清 (浆) 中NADP⁺含量计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) \\ &= 46.2 \times (\Delta A - 0.018) \end{aligned}$$

2、组织、细菌或细胞中NADP⁺含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{ (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 2.31 \times (\Delta A - 0.018) \\ &\div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

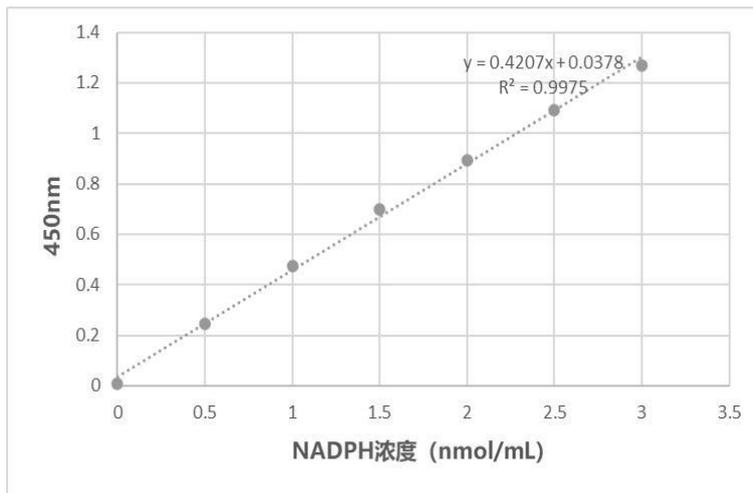
$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{ (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 4.62 \times (\Delta A - 0.018) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ (\text{nmol}/104 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.009 \times (\Delta A - 0.018) \end{aligned}$$

(二) NADPH含量的计算:

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.4207x + 0.0378$, $R^2 = 0.9975$; x 为 NADPH 浓度 (nmol/mL), y 为 ΔA 。

**1、血清 (浆) 中NADPH含量计算**

$$\begin{aligned} \text{NADPH 含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) \\ &= 47.54 \times (\Delta A - 0.0378) \end{aligned}$$

2、组织、细菌或细胞中NADPH含量计算**(1) 按样本蛋白浓度计算**

$$\begin{aligned} \text{NADPH (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \\ &= 2.38 \times (\Delta A - 0.0378) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 2.38 \times (\Delta A - 0.0378) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH (nmol}/104 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.005 \times (\Delta A - 0.0378) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

V2: 加入提取液体积, 1mL;

V3: 加入血清 (浆) 体积: 0.05mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

500: 细胞或细菌总数, 500万。

附: 标准曲线制作过程

1、制备NADP标准品母液 (1umol/mL): 从标准品管A中称取7.4341mg加入10mL蒸馏水得到10mL 1umol/mL 的NADP。

2、制备NADPH标准品母液 (1umol/mL): 在标准品管B中称取8.3335mg加入10mL水得到10mL 1umol/mL NADPH。

3、把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3nmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

4、依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线。

工作液的配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液。

试剂名称 (μL)	工作液
试剂一	100
试剂二	50
试剂三	10

按下表在96孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	标准管	空白管
标准品	50	-
水	-	50
测定工作液	150	150

充分混匀，于450nm下测定吸光值A1，37°C避光孵育30min，450nm下测定吸光值A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

以标准品浓度 (nmol/mL) 为横坐标 (x)，以其对应的吸光值差值 (ΔA) 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，替代结果计算中的标准曲线方程；

NADP标准曲线记为 $y = ax + b$

NADPH标准曲线记为 $y = cx + d$

NADP和NADPH不稳定，如果标准曲线不理想，很有可能是标准品发生了降解。

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。