

辅酶 II NADP(H)含量检测试剂盒 (MTT 显色法) 说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1105

规格：100T/96S

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
碱性提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 4.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四 A	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四 B	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 12 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 1.8 mL 蒸馏水充分混匀，溶解后 2-8℃保存 4 周。
- 2、试剂四：临用前将试剂四 A 溶解到试剂四 B 中溶解，分装保存，避免反复冻融，-20℃ 保存 4 周（其中试剂四 A 为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）。
- 3、NADP 标准品：临用前加入 1.27 mL 蒸馏水，即 5 μmol/mL，-20℃可以保存 2 周。临用前取 10 μL 5 μmol/mL NADP 标准品，加入 990 μL 蒸馏水，配制成 50 nmol/mL NADP 标准品，再取 10 μL 50 nmol/mL NADP 标准品和 390 μL 蒸馏水混合，配制成 1.25 nmol/mL 的 NADP 标准品。
- 4、NADPH 标准品：临用前加入 1.2 mL 蒸馏水，即 5 μmol/mL，-20℃可以保存 2 周。临用前取 10 μL 5 μmol/mL NADPH 标准品，加入 990 μL 蒸馏水，配制成 50 nmol/mL NADPH 标准品，再取 10 μL 50 nmol/mL NADPH 标准品和 390 μL 蒸馏水混合，配制成 1.25 nmol/mL 的 NADPH 标准品。

产品说明：

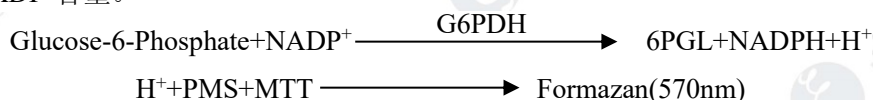
辅酶II NADP(H)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，NADP⁺和 NADPH 含量测定可以计算 NADP (NADPH + NADP⁺)含量和 NADPH/NADP⁺比值，其变化与磷酸戊糖途径和生物合成以及抗氧化反应密切相关。NADPH/NADP⁺比值不仅是细胞氧化还原态的主要标志之一，而且在 PPP 途径、生物合成和抗氧化代谢中具有重要调控作用。

分别用酸性和碱性提取液提取样本中 NADP⁺和 NADPH。NADPH 通过 PMS 的递氢作用，使氧化型噻唑蓝 (MTT) 还原为甲瓚，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⁺为





NADPH, 从而检测 NADP⁺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。

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/细胞超声破碎仪、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⁺和 NADPH 的提取：

NADP⁺的提取：取 0.1mL 血清（浆），加入 0.5mL 酸性提取液，煮沸 5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min；取上清 200μL，加入等体积碱性提取液；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。（相当于 0.1mL 血清（浆）+1.1mL 提取液=1.2mL 液体体积）

NADPH 的提取：取 0.1mL 血清（浆），加入 0.5mL 碱性提取液，煮沸 5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。（相当于 0.1mL 血清（浆）+1.1mL 提取液=1.2mL 液体体积）

2、组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取：

NADP⁺的提取：称取约 0.1g 组织，加入 0.5mL 酸性提取液，冰浴研磨，煮沸 5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积碱性提取液混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。（相当于 0.1g 组织+1mL 提取液）

NADPH 的提取：称取约 0.1g 组织，加入 0.5mL 碱性提取液，冰浴研磨，煮沸 5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。（相当于 0.1g 组织+1mL 提取液）

3、细胞或细菌中 NADP⁺和 NADPH 的提取：

NADP⁺的提取：收集 5 百万细胞或细菌，加入 0.5mL 酸性提取液，超声波破碎 1min（功率 200W，超声 2s，停 1s），煮沸 5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清液 200μL 至另一新的离心管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。（相当于 5 百万细胞/细菌+1mL 提取液）

NADPH 的提取：收集 5 百万细胞或细菌，加入 0.5mL 碱性提取液，超声波破碎 1min（功率 200W，超声 2s，停 1s），煮沸 5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清液 200μL 至另一新的离心管中，加入等体积的酸性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。（相当于 5 百万细胞/细菌+1mL 提取液）

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 570 nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、试剂一、试剂二和试剂三需提前平衡至常温。

3、操作表（在 96 孔板/1.5mL EP 管中按下表依次加样，注意全程避光）：



试剂名称 (μL)	测定管	NADP 或 NADPH 标准管	空白管
样本	10	-	-
标准品	-	10	-
蒸馏水	-	-	10
试剂一	40	40	40
试剂二	15	15	15
试剂三	30	30	30
试剂四	15	15	15
充分混匀，常温避光静置 20min			
试剂五	100	100	100
混匀，在 570nm 下读取吸光值，NADP ⁺ 的记为：ΔA 测定 1=A 测定 1-A 空白，NADPH 的记为 ΔA 测定 2=A 测定 2-A 空白，NADP 标准管的记为 ΔA 标准 1=A 标准 1-A 空白，NADPH 标准管的记为 ΔA 标准 2=A 标准 2-A 空白。（空白管和标准管只需做 1-2 次） 注意：1. 试剂三光稳定性较差，因此整个实验过程需严格避光，反应完成后至测定前也需要避光。 2. 若样本数量多，可以将试剂一、二和四配成工作液，加样后先加工作液，后加试剂三。工作液配制后半小时内用完，不可将试剂三与任何试剂混合后再加，必须分开加。			

三、NADP⁺含量的计算

1、血清（浆）中 NADP⁺含量计算

$$\text{NADP}^+\text{含量 (nmol/mL)} = \Delta A \text{ 测定 1} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 液体} \div V \text{ 血清} \times F = 15 \times \Delta A \text{ 测定 1} \div \Delta A \text{ 标准 1} \times F$$

2、按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+\text{含量 (nmol/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定 1} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ &= 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 1} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

3、按样本质量计算

$$\text{NADP}^+\text{含量 (nmol/g 质量)} = \Delta A \text{ 测定 1} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div W \times F = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 1} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div W \times F$$

4、按细菌或细胞数量计算

$$\text{NADP}^+\text{含量 (nmol/10}^6\text{ cell)} = \Delta A \text{ 测定 1} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div N \times F = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 1} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div N \times F$$

C 标：NADP 标准品的浓度，1.25nmol/mL；V 提取：加入提取液总体积，1mL；V 液体：血清（浆）提取时的总体积，1.2mL；V 血清：提取时加入的血清（浆）体积，0.1mL；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞数量，以 10⁶ 计；F：稀释倍数。

四、NADPH 含量的计算

1、血清（浆）中 NADPH 含量计算

$$\text{NADPH 含量 (nmol/mL)} = \Delta A \text{ 测定 2} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 液体} \div V \text{ 血清} \times F = 15 \times \Delta A \text{ 测定 2} \div \Delta A \text{ 标准 2} \times F$$

2、按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH 含量 (nmol/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定 2} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ &= 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 2} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$





3、按样本质量计算

$\text{NADPH 含量 (nmol/g 质量)} = \Delta A \text{ 测定 } 2 \div (\Delta A \text{ 标准 } 2 \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div W \times F = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \div W \times F$

4、按细菌或细胞数量计算

$\text{NADPH 含量 (nmol/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \text{ 测定 } 2 \div (\Delta A \text{ 标准 } 2 \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div N \times F = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \div N \times F$

C 标: NADPH 标准品的浓度, 1.25nmol/mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; V 液体: 血清(浆)提取时的总体积, 1.2mL; V 血清: 提取时加入的血清(浆)体积, 0.1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞数量, 以 10^6 计; F: 稀释倍数。

注意事项:

- 1、NADP⁺和 NADPH 稳定性较差, 建议使用新鲜样本进行测定。
- 2、本实验常温范围需为 20-25°C。
- 3、当 A 测定>1.2 时, 建议将样本用蒸馏水稀释后重新测定。
- 4、提取液会使蛋白变性, 若要以蛋白浓度计算需要重提样本。
- 5、每个测定管可以测定 1 个样本的 NADP⁺或 NADPH, 本试剂盒 100T 可以测定 96 个样本的 NADP⁺或 NADPH (或 48 个样本的 NADP⁺和 NADPH)。

实验实例:

1. **NADP⁺的测定:** 称取 0.103g 鸡肝, 按提取步骤提取后用蒸馏水稀释 4 倍, 之后按照测定步骤操作, 96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A \text{ 测定 } 1 = A \text{ 测定 } 1 - A \text{ 空白} = 0.843 - 0.225 = 0.618$, $\Delta A \text{ 标准 } 1 = A \text{ 标准 } 1 - A \text{ 空白} = 0.878 - 0.225 = 0.653$, 按样本质量计算 NADP⁺ 含量得:
 $\text{NADP}^+ \text{ 含量 (nmol/g 质量)} = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准 } 1 \div W \times F = 1.25 \times 0.618 \div 0.653 \div 0.103 \times 4 = 45.94 \text{ nmol/g 质量}$
NADPH 的测定: 称取 0.099g 鸡肝, 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 $\Delta A \text{ 测定 } 2 = A \text{ 测定 } 2 - A \text{ 空白} = 1.168 - 0.225 = 0.943$, $\Delta A \text{ 标准 } 2 = A \text{ 标准 } 2 - A \text{ 空白} = 0.861 - 0.225 = 0.636$, 按样本质量计算 NADPH 含量得:
 $\text{NADPH 含量 (nmol/g 质量)} = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \div W \times F = 1.25 \times 0.943 \div 0.636 \div 0.099 \times 1 = 18.72 \text{ nmol/g 质量}$
2. **NADP⁺的测定:** 称取 0.100g 绿萝叶片, 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 $\Delta A \text{ 测定 } 1 = A \text{ 测定 } 1 - A \text{ 空白} = 0.738 - 0.225 = 0.513$, $\Delta A \text{ 标准 } 1 = A \text{ 标准 } 1 - A \text{ 空白} = 0.878 - 0.225 = 0.653$, 按样本质量计算 NADP⁺ 含量得:
 $\text{NADP}^+ \text{ 含量 (nmol/g 质量)} = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准 } 1 \div W \times F = 1.25 \times 0.513 \div 0.653 \div 0.100 \times 1 = 9.82 \text{ nmol/g 质量}$
NADPH 的测定: 称取 0.100g 绿萝叶片, 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 $\Delta A \text{ 测定 } 2 = A \text{ 测定 } 2 - A \text{ 空白} = 0.338 - 0.225 = 0.113$, $\Delta A \text{ 标准 } 2 = A \text{ 标准 } 2 - A \text{ 空白} = 0.861 - 0.225 = 0.636$, 按样本质量计算 NADPH 含量得:
 $\text{NADPH 含量 (nmol/g 质量)} = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \div W \times F = 1.25 \times 0.113 \div 0.636 \div 0.099 \times 1 = 2.24 \text{ nmol/g 质量}$

相关系列产品:

- BC0310/BC0315 辅酶I NAD(H) 含量检测试剂盒
- BC0440/BC0445 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性检测试剂盒
- 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

