辅酶 II NADP+/NADPH 含量试剂盒说明书

（货号：PB1032F24　分光法　24 样）

有效期：3 个月

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

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

所需的仪器和用品

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

酸性提取液：50mL×1 瓶，4℃保存；
碱性提取液：50mL×1 瓶，4℃保存；
试剂一：液体 15 mL×1 瓶，4℃保存；
试剂二：粉剂×1 支，-20 ℃保存，用时加入 6mL 双蒸水，混匀；用不完的试剂仍-20℃保存；
试剂三：粉剂×1 支，-20℃保存，用时加入 6mL 双蒸水，混匀；用不完的试剂 4℃保存；
试剂四：粉剂×1 支，4 ℃保存，用时加入 6mL 双蒸水，混匀；用不完的试剂仍 4℃保存；
试剂五：液体 6mL×1 瓶，-20 ℃保存；若未能一次用完，可进行分装，避免反复冻融；
试剂六：液体 30mL×1 瓶，4 ℃保存；
试剂七：液体 50mL×1 瓶，4 ℃保存。

$NADP^+$和 NADPH 的提取

1 血清（浆）中 $NADP^+$和 NADPH 的提取

$NADP^+$的提取：取约 0.1mL 血清（浆），加入 0.5mL 酸性提取液，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4 ℃离心 10min；取上清液 200 μl 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，置冰上待测。

NADPH 的提取：取约 0.1mL 血清（浆），加入 0.5mL 碱性提取液，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4 ℃离心 10min；取上清液 200 μl 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，置冰上待测。

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（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4 ℃离心 10min；取上清液 200 μl 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，置冰上待测。

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（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4 ℃离心 10min；取上清液 200 μl 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，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 500 万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加入 0.5mL 酸性提取液，超声波破碎 1min（强度 20%，超声 2s，停 1s），煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失）；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，置冰上待测。

NADPH 的提取：先收集 500 万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加入 0.5mL 碱性提取液，超声波破碎 1min（强度 20%，超声 2s，停 1s），煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失）；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，置冰上待测。

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 570nm，蒸馏水调零。

2、标准曲线的制备 ：使用前分别将 2 μmol/mL NADP+标准液和 2 μmol/mL NADPH 标准液使用蒸馏水稀释至 20 nmol/mL NADP+标准稀释液和 20 nmol/mL NADPH 标准稀释液。

名称	NADP+	NADPH
稀释前标准品浓度(μmol/mL)	2	2
标准液体积（μl）	10	10
蒸馏水体积（μl）	990	990
稀释后标准品浓度(nmol/mL)	20	20

NADP+标准曲线的制备:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥
标准品浓度(nmol/mL)	2	1.5	1	0.5	0.25	0
稀释前标准品浓度（nmol/mL）	20	20	20	20	20	20
标准液体积（μl）	40	30	20	10	5	0
蒸馏水体积（μl）	360	370	380	390	395	400

NADPH 标准曲线的制备:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥
标准品浓度(nmol/mL)	2	1.5	1	0.5	0.25	0
稀释前标准品浓度（nmol/mL）	20	20	20	20	20	20
标准液体积（μl）	40	30	20	10	5	0
蒸馏水体积（μl）	360	370	380	390	395	400

测定步骤(在 1.5mL 棕色 EP 管中按下表依次加样）

试剂名称(μL)	对照管	测定管	标准管（NAD+或 NADH）
样本	50	50	—
标准品	—	—	50
试剂六	500	—	—

试剂一	200	200	200
试剂二	75	75	75
试剂三	75	75	75
试剂四	75	75	75
试剂五	75	75	75
混匀，室温避光静置 20min			
试剂六	—	500	500

充分混匀，静置 5min 后，12000rpm，常温离心 10min，弃上清，沉淀中加入：

试剂七	1000	1000	1000

充分振荡使沉淀完全溶解，取 1ml 转移至石英比色皿中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准；计算ΔA 测定=A 测定-A 对照，ΔA 标准=A 标准-A 空白（0nmol/ml 标准品）。注：每个样品均需设一个对照管。

注意事项

1、不可将试剂一、二、三和四混合后再加，必须分开加。
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 管保证测 24 个 $NADP^+$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。

$NADP^+$含量的计算

标准曲线的绘制以 NAD+各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值（ΔA 标准）为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，将 ΔA 测定带入公式中得到 x（nmol/ml）。

（1）按样本蛋白浓度计算：

NADP+（nmol/mg prot）=x×V 提取÷V 提取÷Cpr=x÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

NADP+（nmol/g 鲜重）=x×V 提取÷W=x÷W

（3）按液体体积计算：

NADP+（nmol/ml）=x×（V 提取+V 血清）÷V 血清=11×x

（4）按细菌或细胞数量计算：

NADP+（nmol/10^4 cell）=x×V 提取÷500=0.002×x

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量，g; V 提取：加入提取液体积，1mL；500：细胞或细菌总数，500 万；V 血清：提取时加入血清体积，0.1ml。

NADPH 含量的计算

标准曲线的绘制以 NADH 各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值（ΔA 标准）为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，将 ΔA 测定带入公式中得到 x（nmol/ml）。

（1）按样本蛋白浓度计算：

NADPH（nmol/mg prot）=x×V 提取÷V 提取÷Cpr=x÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

NADPH（nmol/g 鲜重）=x×V 提取÷W=x÷W

（3）按液体体积计算：

NADPH（nmol/ml）=x×（V 提取+V 血清）÷V 血清=11×x

（4）按细菌或细胞数量计算：

NADPH（nmol/10^4 cell）=x×V 提取÷500=0.002×x

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量，g; V 提取：加入提取液体积，1mL；500：细胞或细菌总数，500 万；V 血清：提取时加入血清体积，0.1ml。