

辅酶 II NADP⁺/NADPH 含量检测试剂盒说明书

(货号: PB1032W48 微量法 48 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。

所需的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

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;

试剂一: 液体 10 mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 粉剂×1 支, -20℃保存, 用时加入 4mL 双蒸水, 混匀; 用不完的试剂仍-20℃保存;

试剂三: 粉剂×1 支, -20℃避光保存, 用时加入 4mL 双蒸水, 混匀; 用不完的试剂-20℃避光保存;

试剂四: 粉剂×1 支, 4℃避光保存, 用时加入 4mL 双蒸水, 混匀; 用不完的试剂仍 4℃避光保存;

试剂五: 液体 3.6mL×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⁺标准品: 粉剂×1 支, -20℃避光保存, 使用前加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NADP⁺标准液, 4℃可保存 1 周);

NADPH 标准品: 粉剂×1 支, -20℃避光保存, 使用前加入 1.2 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NADPH 标准液, 4℃可保存 1 周);

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 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: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 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。

1、分光光度计或酶标仪预热 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	20	20	—
标准品	—	—	20
试剂六	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
试剂五	30	30	30
混匀，室温避光静置 20min			
试剂六	—	200	200

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	400	400	400
-----	-----	-----	-----

充分振荡使沉淀完全溶解，取 200 μL 转移至微量石英比色皿或 96 孔板中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准；计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ (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 100 管保证测 48 个 NAD⁺或 NADH。
- 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 ($\Delta A_{标准}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{测定}$ 带入公式中得到 x (nmol/mL)。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

$$NADP^+ \text{ (nmol/mg prot)} = x \times V_{提取} \div V_{提取} \div Cpr = x \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

$$NADP^+ \text{ (nmol/g 鲜重)} = x \times V_{提取} \div W = x \div W$$

(3) 按液体体积计算：

$$NADP^+ \text{ (nmol/ml)} = x \times (V_{提取} + V_{血清}) \div V_{血清} = 11 \times x$$

(4) 按细菌或细胞数量计算：

$$NADP^+ \text{ (nmol/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{提取} \div 500 = 0.002 \times x$$

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：

$$\text{NADPH (nmol/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{提取}} \div \text{Cpr} = x \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算：

$$\text{NADPH (nmol/g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$

（3）按液体体积计算：

$$\text{NADPH (nmol/ml)} = x \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x$$

（4）按细菌或细胞数量计算：

$$\text{NADPH (nmol/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x$$

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。