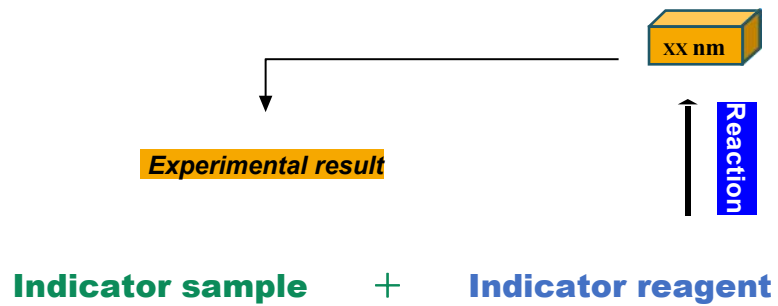


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 辅酶 II NADP (H) 含量试剂盒说明书 可见分光光度法

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

### 产品简介：

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。NADPH通过PMS的递氢作用，使氧化型噻唑蓝(MTT)还原为甲瓏，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<sup>+</sup>为NADPH，从而检测NADP<sup>+</sup>含量。

### 试验中所需的仪器和试剂：

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

### 试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	基质缓冲液15 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；
试剂三	粉剂×1支	-20℃保存	用时加入4mL双蒸水，混匀；
试剂四	粉剂×1支	4℃保存	用时加入4mL双蒸水，混匀；
试剂五	液体1.8mL×1支	4℃保存	
试剂六	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂七	液体50mL×1瓶	4℃保存	

### 操作步骤：

#### 一、NADP和NADPH的提取：

##### 1、血清（浆）中NADP和NADPH的提取：

取0.1mL血清（浆），加入0.9mL酸性提取液，煮沸5min；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的碱性提取液使之中和；10000g 4℃离心10min，取上清液冰上保存供测定NADP<sup>+</sup>含量。

取0.1mL血清（浆），加入0.9mL碱性提取液，煮沸5min，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的酸性提取液使之中和，10000g 4℃离心10min，取上清液冰上保存供测定NADPH含量。

## 2、组织中NADP和NADPH的提取：

称取约0.1g组织，加入0.9mL酸性提取液，冰浴研磨，煮沸5min，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，10000g 4℃离心10min，取上清液冰上保存供测定NADP<sup>+</sup>含量。

称取约0.1g组织，加入0.9mL碱性提取液，冰浴研磨，煮沸5min，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的酸性提取液使之中和，10000g 4℃离心10min，取上清液冰上保存供测定NADPH含量。

## 3、细胞或细菌中NADP和NADPH的提取：

先收集400-500万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加入0.9mL酸性提取液，超声波破碎1min（强度20%，超声2s，停1s），煮沸5min，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，10000g 4℃离心10min，取上清液冰上保存供测定NADP<sup>+</sup>含量。

先收集400-500万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加入0.9mL碱性提取液，超声波破碎1min（强度20%，超声2s，停1s），煮沸5min，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的酸性提取液使之中和，10000g 4℃离心10min，取上清液冰上保存供测定NADPH含量。

## 二、测定步骤(在1.5m棕色LEP管中按下表依次加样)：

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至570nm，蒸馏水调零。

2、加样表(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
样本	50	50
试剂一	250	250
试剂二	75	75
试剂三	75	75
试剂四	75	75
试剂五	35	35
试剂六	500	混匀，室温避光静置 20min
试剂六		500
充分混匀，静置 5min 后，20000g，25℃离心 5min，弃上清，沉淀中加入：		
试剂七	1000	1000

混匀，570nm 下比色，读取对照吸光值 A1 和测定管吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

### 注意事项

- 1、如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三和四按比例配成混合液。
- 2、对照管和测定管的测定步骤的区别：对照管加完试剂一、二、三、四和五后必须马上加试剂六；测定管加完试剂一、二、三、四和五后必须反应20min后再加试剂六。
- 3、反应过程中注意避光。
- 4、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<sup>+</sup>或 NADPH。