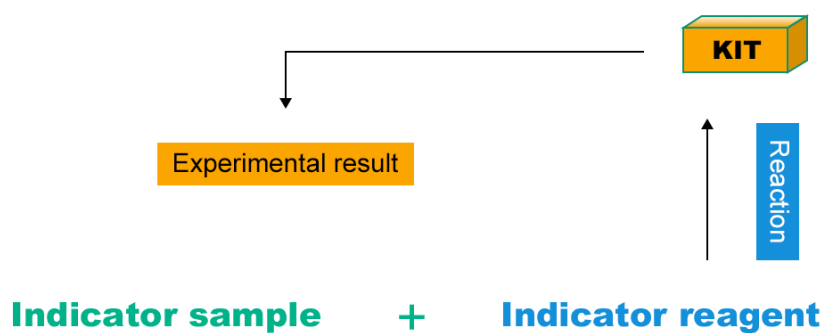


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0579

Size: 50T/24S

NADP/NADPH 定量检测试剂盒(辅酶 II NADP(H) 说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

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 15mL × 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	

五、操作步骤：

● 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⁺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⁺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 °C离心 10min,取上清液冰上保存供测定 NADP⁺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 °C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 °C离心 10min,取上清液冰上保存供测定 NADPH 含量。

● 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°C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 $\Delta A=A2-A1$ 。

六、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⁺或 NADPH。

七、NAD⁺和 NADH 含量的计算

NADP⁺和 NADPH 含量的计算：

（一）NADP⁺含量的计算

1、血清（浆）中 NADP⁺含量计算

$$\text{NADP}^+ \text{含量} (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A - 0.047) \times 376$$

2、组织中 NADP⁺含量计算

（1）按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\mu\text{mol/g prot}) = (\Delta A - 0.047) \times 37.6 \div \text{样本蛋白浓度}$$

（2）按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+ (\mu\text{mol/g mass}) = (\Delta A - 0.047) \times 37.6 \div \text{样本鲜重}$$

3、细胞或细菌中 NADP⁺含量计算

（1）按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\mu\text{mol/g prot}) = (\Delta A - 0.047) \times 37.6 \div \text{样本蛋白浓度}$$

（2）按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+ (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.047) \times 37.6 \div \text{细菌或细胞}$$

(二) NADPH 含量的计算

1、血清（浆）中 NADPH 含量计算

$$\text{NADPH 含量} (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A - 0.047) \times 855$$

2、组织中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\mu\text{mol/g prot}) = (\Delta A - 0.047) \times 85.5 \div \text{样本蛋白浓度}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH} (\mu\text{mol/g mass}) = (\Delta A - 0.047) \times 85.5 \div \text{样本鲜重}$$

3、细胞或细菌中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\mu\text{mol/g prot}) = (\Delta A - 0.047) \times 85.5 \div \text{样本蛋白浓度}$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH} (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.047) \times 85.5 \div \text{细菌或细胞密度}。$$

注意：最低检测限为 1nmol/mL 或 1nmol/g 鲜重或 0.01nmol/mg prot