



辅酶 II NADP(H)含量检测试剂盒说明书(精简版)

(货号: A115-1-1 规格: 50T/24 样 分光光度法)

一、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。

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、仪器设备(自备):

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

四、试剂组成:(试剂盒有效期3个月)

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4mL 蒸馏水, 混匀; 用不完的试剂4℃保存一周;

试剂三: 粉剂×1 支, -20℃保存, 用时加入4mL 蒸馏水, 混匀; 用不完的试剂4℃保存一周;

试剂四: 粉剂×1 支, 4℃保存, 用时加入4mL 蒸馏水, 混匀; 用不完的试剂4℃保存一周;

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:(假如 NADP⁺和 NADPH 均要测定,则可测样本数减为 12)

(一) NADP⁺和NADPH 的提取:

1、血清(浆)中NADP⁺和NADPH 的提取:

NADP⁺的提取: 按照血清(浆)体积(mL): 酸性提取液体积(mL)为1: 5~10 的比例(建议取约0.1mL血清(浆), 加入1mL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: 按照血清(浆)体积(mL): 碱性提取液体积(mL)为1: 5~10 的比例(建议取约0.1mL血清(浆), 加入1mL 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: 按照组织质量(g): 酸性提取液体积(mL)为1: 5~10 的比例(建议取约0.1g组织, 加入1mL 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: 按照组织质量(g): 碱性提取液体积(mL)为1: 5~10 的比例(建议取约0.1g 组织, 加入1mL 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: 先收集细胞或细菌到离心管内, 弃上清, 按照细菌或细胞数量(10⁴ 个): 酸性提取液体积(mL)为500~1000: 1 的比例(建议500 万细菌或细胞加入1mL 酸性提取液), 超声波破碎1min(冰浴, 强度20%或200W, 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: 先收集细胞或细菌到离心管内, 弃上清, 按照细菌或细胞数量(10⁴ 个): 碱性提取液体积(mL)为500~1000: 1 的比例(建议500 万细菌或细胞加入1mL 碱性提取液), 超声波破碎1min(冰浴, 强度20%或200W, 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。

(二) 测定步骤:(在1.5mL 棕色EP管中按下表依次加样, 反应过程需要避光):

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		
试剂七	1000	1000
混匀, 波长570nm, 光径1cm, 双蒸水调零测定对照吸光值A1和测定管吸光值A2, 计算ΔA=A2-A1。		

注: 对照管试剂五加完后必须马上加入试剂六, 而测定管加完试剂五之后必须反应20min后再加试剂六。

六、计算公式:

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:

$$\text{NADP}^+ \text{ 含量 (nmol/ml)} = \frac{[4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1]}{(V3 \times V1 \div V2)} = 91.4 \times (\Delta A - 0.062)$$

2、组织、细菌或细胞中NADP⁺含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ \text{ 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{[4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1]}{(V1 \times Cpr)} = 4.57 \times (\Delta A - 0.062) \div Cpr$$

(2)按样本鲜重计算



$$\text{NADP}^+ \text{ 含量 (nmol/g组织)} = \frac{[4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1]}{(W \times V1 \div V2)} = 9.14 \times (\Delta A - 0.062) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+ \text{ 含量 (nmol/10}^4\text{细胞)} = \frac{[4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1]}{(500 \times V1 \div V2)} = 0.0183 \times (\Delta A - 0.062)$$

(二) NADPH 含量的计算**1、血清（浆）中NADPH 含量计算**

$$\text{NADPH 含量 (nmol/ml)} = \frac{[7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1]}{(V3 \times V1 \div V2)} = 144 \times (\Delta A - 0.072)$$

2、组织、细菌或细胞中NADPH 含量计算**(1)按样本蛋白浓度计算**

$$\text{NADPH 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{[7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1]}{(V1 \times Cpr)} = 7.2 \times (\Delta A - 0.072) \div Cpr$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADPH 含量 (nmol/g组织)} = \frac{[7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1]}{(W \times V1 \div V2)} = 14.4 \times (\Delta A - 0.072) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH 含量 (nmol/10}^4\text{细胞)} = \frac{[7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1]}{(500 \times V1 \div V2)} = 0.0288 \times (\Delta A - 0.072)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL;**V2:** 加入提取液体积, 2mL;**V3:** 加入血清（浆）体积: 0.1mL;**Cpr:** 样本蛋白质浓度, mgprot/mL(prot指蛋白);**W:** 样本质量, g;**500:** 细胞或细菌总数, 500 万。**七、注意事项:**

- 1、如果一次性测定样本数较多, 可将试剂一、二、三、四按比例配制成混合液, 现用现配。
- 2、反应过程中注意避光。
- 3、由于每个管需要设定一个对照管, 本试剂盒50管可测24份NADP⁺或NADPH, 二者都测则可测12份。
- 4、最低检测限为1nmol/mL或1nmol/g组织鲜重或者0.01nmol/mgprot