

Coenzyme II NADP⁺/NADPH Content Kit辅酶II NADP⁺/NADPH 含量试剂盒说明书

货号: G0802W | 方法: 微板法 | 规格: 48 样

(可测 48 个 NADP⁺和 48 个 NADPH)

一、产品简介:

烟酰胺核苷酸的测定一直是细胞或组织在能量转化和氧化还原状态方面的研究热点。NADP⁺/NADPH 比值不仅是细胞氧化还原态的主要标志之一, 而且在生物物质合成和抗氧化代谢中具有重要调控作用。

本试剂盒提供一种方便, 快速的检测方法, 提供特异性提取液分别提取样品中的 NADP⁺和 NADPH, NADPH 在递氢体作用下与一种高灵敏度的显色剂反应生成黄色水溶性甲瓚, 在 450nm 下检测, 得到 NADPH 含量。利用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶特异性还原 NADP⁺为 NADPH, 从而检测 NADP⁺含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液A	液体120mL×1瓶	4℃保存	
提取液B	液体120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体μL×1支	-20℃保存	用前用1.1mL蒸馏水溶解
试剂二	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前用1.1mL蒸馏水溶解
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	EP管1mL×1支	4℃保存	
标准品	EP管μg×1支	-20℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、辅酶II NADP⁺/NADPH 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

由于 NADP⁺ 和 NADPH 很不稳定, 较易降解, 尽量使用新鲜样品进行检测。

1、样本制备 (制备完成的 NAD⁺/NADH 待测上清液需尽快检测, 以免降解):① 组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

NADP⁺的提取: 取约 0.1g 组织 (水分充足样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液 A, 冰浴研磨, 全部转移到 EP 管中 (用提取液 A 补齐到 1mL), 植物样本于 95℃孵育 5min 或动物样本于 60℃孵育 30min, 取出后立即冰浴 (或放冰箱) 5min; 12000rpm 4℃离心 10min; 取 500μL 上清液至新 EP 管中, 再加 V1 体积的提取液中和 (可分次添加提取液 B, 调至 PH 约中性, 并记录 V1); 12000rpm, 4℃离心 5min, 取上清液置于冰上待测。

NADPH的提取: 取约0.1g组织 (水分充足样本可取0.5g), 加入1mL提取液B, 冰浴研磨, 全部转移到EP管中 (用提取液B补齐到1mL), 植物样本于95℃孵育5min或动物样本于60℃

孵育30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和（可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2）；12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增加到0.2g等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

② 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：取约500万细菌或细胞加入1ml提取液A，冰浴研磨，全部转移到EP管中（用提取液A补齐到1mL），于60℃孵育30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和（可分次添加提取液B，调至PH约中性，并记录V1）；12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADPH 的提取：先收集细胞或细菌到离心管内：取约500万细菌或细胞加入1mL提取液B，冰浴研磨，全部转移到EP管中（用提取液B补齐1mL），于60℃孵育30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和（可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2）；12000rpm 4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至1000万等，可做几个梯度选适合本次实验的样本量。

③ 液体中NADP⁺和NADPH的提取：

NADP⁺的提取：取约0.1mL液体至EP管中，再加入1mL提取液A（用提取液A补齐到1.1mL），于95℃孵育5min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和（可分次添加提取液B，调至PH约中性，并记录V1）；12000rpm 4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADPH的提取：取约0.1mL液体至EP管中，再加入1mL提取液B（用提取液B补齐到1.1mL），于95℃孵育5min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和（可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2）；12000rpm 4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至0.5mL等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

2、上机检测：

① 酶标仪预热30min以上，温度设定37℃，调节波长至450nm。

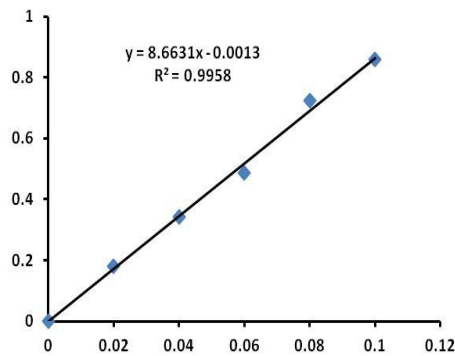
② 在 96 孔板中按下表依次加入试剂：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
37°C避光孵育 10min	
试剂四	10
混匀， 37°C条件下， 立即在 450nm 处测定吸光值 A1， 30min 后再测定 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线的公式： $y = 8.6631x - 0.0013$ ：x 是 NADPH 摩尔质量 (nmol)，y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、NADP⁺含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0013) \div 8.6631] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 11.54 \times (\Delta A + 0.0013) \times (0.5 + V_1) \div W \end{aligned}$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0013) \div 8.6631] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 0.023 \times (\Delta A + 0.0013) \times (0.5 + V_1) \end{aligned}$$

(3)液体中 NADP⁺含量计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{含量} (\text{nmol/mL}) &= [(\Delta A + 0.0013) \div 8.6631] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 115.43 \times (\Delta A + 0.0013) \times (0.5 + V_1) \end{aligned}$$

3、NADPH 含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0013) \div 8.6631] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 11.54 \times (\Delta A + 0.0013) \times (0.5 + V_2) \div W \end{aligned}$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0013) \div 8.6631] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 0.023 \times (\Delta A + 0.0013) \times (0.5 + V_2) \end{aligned}$$

(3)液体中 NADPH 含量计算:

$$\text{NADPH 含量(nmol/mL)}=[(\Delta A+0.0013)\div 8.6631]\div (V_{\text{液}}\div 2\times V_{\text{样}}\div V_4)\\ =115.43\times (\Delta A+0.0013)\times (0.5+V_2)$$

V 样---加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V 液---所取液体样本体积: 0.1mL;

V3---NADP⁺提取液体积: 0.5mL 提取液 A+ V1mL 提取液 B= (0.5+V1) mL;

V4---NADPH 提取液体积: 0.5mL 提取液 B+ V2mL 提取液 A= (0.5+V2) mL;

W---样本质量, g; 500---细胞或细菌总数, 500 万; NADPH 分子量---745.4;