



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

NADP/NADPH定量试剂盒(分光光度法)

货号: R41947

规格: 50T/24S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
酸性提取液	25mL×1瓶	2-8℃保存
碱性提取液	25mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-A	15 mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1支	2-8℃保存, 用时加入4mL蒸馏水, 混匀; 溶解后2-8℃保存一周
试剂-C	粉剂×1支	-20℃保存, 用时加入4mL蒸馏水, 混匀; 溶解后2-8℃保存一周
试剂-D	粉剂×1支	2-8℃保存, 用时加入4mL蒸馏水, 混匀; 溶解后2-8℃保存一周
试剂-E	2mL×1支	2-8℃保存
试剂-F	30mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-G	50mL×1瓶	2-8℃保存
NADP标准品	粉剂×1支	-20℃保存, 临用前加入1.27mL蒸馏水, 即5μmol/mL, -20℃可以保存2周; 再将其稀释为1nmol/mL的NADP标准溶液备用
NADPH标准品	粉剂×1支	-20℃保存, 临用前加入1.2mL蒸馏水, 即5μmol/mL, -20℃可以保存2周; 再将其稀释为1nmol/mL的NADPH标准溶液备用

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯 (NADP) 是一种酶促辅因子, 参与许多氧化还原反应, 在还原态 (NADPH) 和氧化态 (NADP) 之间循环。NADP 还参



与生物合成反应，如脂质和核酸的合成，在那里它作为还原剂发挥作用。戊糖磷酸途径（PPP）的氧化分支是动物细胞产生 NADPH 的主要来源。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。

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；再利用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原 NADP⁺为 NADPH，进一步采用 MTT 还原法检测 NADP⁺含量。

自备用品：

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

NADP⁺和 NADPH 的提取：

1. 血清（浆）中 NADP⁺和 NADPH 的提取：

（1）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），95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

（2）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），95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 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：



(1) 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, 95°C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4°C 离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

(2) 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, 95°C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4°C 离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 细胞或细菌中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

(1) 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), 95°C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4°C 离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

(2) 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), 95°C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4°C 离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 570nm, 蒸馏水调零。
2. 在 1.5mL 棕色 EP 管中按下表依次加入下列试剂:

试剂名称	对照管(μL)	测定管(μL)	NADP或NADPH标准管(μL)	空白管(μL)
------	---------	---------	-------------------	---------



样本	50	50		
标准品			50	
蒸馏水				50
试剂-A	250	250	250	250
试剂-B	75	75	75	75
试剂-C	75	75	75	75
试剂-D	75	75	75	75
试剂-E	35	35	35	35
试剂-F	500	混匀, 室温避光静置20min		
试剂-F		500	500	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-G	1000	1000	1000	1000
混匀, 570nm 下比色, 读取吸光值, ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, NADP 标准管的记为 ΔA 标准 1=A 标准管 1-A 空白管, NADPH 标准管的记为 ΔA 标准 2=A 标准管 2-A 空白管。(空白管只需做 1-2 次)				

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

$$\begin{aligned}\text{NADP}^+\text{含量 (nmol/mL)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div V \text{ 血清} \\ &= 20 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}\end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{NADP}^+ \text{ (nmol/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div (V \text{ 提取} \\ &\times C_{\text{pr}}) = 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned}\text{NADP}^+ \text{ (nmol/g 鲜重)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div W \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div W\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{NADP}^+ \text{ (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div 500 \\ &= 0.004 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1};\end{aligned}$$



(二) NADPH 含量的计算

1. 血清(浆)中 NADPH 含量计算

$$\text{NADPH 含量 (nmol/mL)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div V \text{ 血清}$$
$$\text{血清} = 20 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH (nmol/mg prot)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div (V \text{ 提取} \times C_{\text{pr}})$$
$$= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH (nmol/g 鲜重)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div W$$
$$= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH (nmol/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div 500$$
$$= 0.004 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}$$

注: C 标: NAD 或 NADH 标准溶液的浓度 1nmol/mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; 2: 提取过程中上清液稀释倍数; V 血清: 加入血清(浆)体积: 0.1mL; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

注意事项:

1. 对照管和测定管的测定步骤的区别: 对照管加完试剂-A、B、C、D、E 后必须马上加试剂-F; 测定管加完试剂-A、B、C、D、E 后必须反应 20min 后再加试剂-F。

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 50 管保证测 24 个 NADP⁺ 或 NADPH。