



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(微量法))

货号: R41948

规格: 100T/48S

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	50mL×1瓶	2-8℃保存
碱性提取液	50mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-A	10 mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1支	2-8℃保存, 用时加入3mL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3mL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3mL蒸馏水, 混匀; 溶解后2-8℃保存一周
试剂-E	3mL×1支	2-8℃保存
试剂-F	20mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-G	40mL×1瓶	2-8℃保存
NADP标准品	粉剂×1支	-20℃保存, 临用前加入1.27 mL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/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、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°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°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。

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 500 μ L 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 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(μ L)	测定管(μ L)	NADP或NADPH标准管(μ L)	空白管(μ L)
样本	20	20		
标准品			20	
蒸馏水				20
试剂-A	80	80	80	80



试剂-B	30	30	30	30
试剂-C	30	30	30	30
试剂-D	30	30	30	30
试剂-E	30	30	30	30
试剂-F	200	混匀, 室温避光静置20min		
试剂-F		200	200	200
充分混匀, 静置5min后, 20000g, 25℃离心5min, 弃上清, 沉淀中加入:				
试剂-G	400	400	400	400
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

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

2. 组织、细菌或细胞中 NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细菌或细胞数量计算

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

(二) NADPH 含量的计算

1. 血清(浆)中 NADPH 含量计算



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

2. 组织、细菌或细胞中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(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 100 管保证测 48 个 NADP⁺ 或 NADPH。

4. 最好采用新鲜样本进行测定, 以准确反映该指标含量。