Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

辅酶 II NADP(H)含量检测试剂盒（MTT 显色法）说明书

微量法

货号： BC1105

规格： 100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
碱性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 8mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四 A	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂四 B	液体 5mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂六	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
NADP 标准品	粉剂×1 支	-20°C保存
NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

1、 试剂二：临用前加入 4mL 蒸馏水充分混匀，溶解后 2-8°C保存 4 周。

2、 试剂四：临用前将试剂四 A 溶解到试剂四 B 中，溶解后加入 5mL 蒸馏水，分装保存，避免反复冻融，-20°C保存 4 周。

3、 NADP 标准品：临用前加入 1.27 mL 蒸馏水，即 5 μmol/mL，-20°C可以保存 2 周。

4、 NADPH 标准品：临用前加入 1.2 mL 蒸馏水，即 5 μmol/mL，-20°C可以保存 2 周。

产品说明：

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。

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）还原为甲瓒，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。

$$\text{Glucose 6-Phosphate} + NADP^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{6PGL} + NADPH + H^+$$

$$H^+ + PMS + MTT \longrightarrow \text{Formazan(570nm)}$$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、超声破碎仪、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、血清（浆）中 $NADP^+$和 NADPH 的提取：

$NADP^+$的提取：取 0.1mL 血清（浆），加入 0.5mL 酸性提取液，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min；取上清 200μL，加入等体积碱性提取液；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

NADPH 的提取：取 0.1mL 血清（浆），加入 0.5mL 碱性提取液，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

2、组织中 $NADP^+$和 NADPH 的提取：

$NADP^+$的提取：称取约 0.1g 组织，加入 0.5mL 酸性提取液，冰浴研磨，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积碱性提取液混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

NADPH 的提取：称取约 0.1g 组织，加入 0.5mL 碱性提取液，冰浴研磨，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

3、细胞或细菌中 $NADP^+$和 NADPH 的提取：

$NADP^+$的提取：收集 500 万细胞或细菌，加入 0.5mL 酸性提取液，超声波破碎 1min（功率 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 200μL 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，冰上保存待测。

NADPH 的提取：收集 500 万细胞或细菌，加入 0.5mL 碱性提取液，超声波破碎 1min（功率 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 200μL 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，冰上保存待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、 NADP 标准品：用蒸馏水稀释为 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0nmol/mL 的标准溶液（0nmol/mL 即空白管）。

3、 NADPH 标准品：用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0nmol/mL 的标准溶液（0nmol/mL 即空白管）。

4、 稀释表（**附于说明书最后**）

5、 在 EP 管中按顺序加入下列试剂：

试剂名称（μL）	对照管（A_1、A_1’）	测定管（A_2、A_2’）	标准管
样本	20	20	
标准品			20
试剂五	200	-	-

试剂一	80	80	80
试剂二	30	30	30
试剂三	60	60	60
试剂四	30	30	30
-	-	充分混匀，室温避光静置 20min	
试剂五		200	200
充分混匀，静置 5min 后，20000g 25℃离心 5min，弃上清，在沉淀中加入			
试剂六	400	400	400

混匀，取 200μL 至微量玻璃皿或 96 孔板中，在 570nm 下读取吸光值，$NADP^+$的记为：$\Delta A_{NADP+}= A_2- A_1$，NADPH 的记为 $\Delta A_{NADPH}= A_2'- A_1'$，NADP 标准管的记为 $\Delta A_{NADP标}= A_{标}-A_{空白管}$。NADPH 标准管的记为 $\Delta A_{NADPH标}= A_{标}'-A_{空白管}$。（标准曲线只需做 1-2 次）

三、$NADP^+$和 NADPH 含量计算

1、标准曲线绘制：

（1） **$NADP^+$**标准曲线的绘制：根据标准管的浓度（x_1，nmol/mL）和吸光度ΔA标准（y_1，ΔA标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA代入方程得到x_1（nmol/mL）。

（2）**NADPH**标准曲线的绘制：根据标准管的浓度（x_2，nmol/mL）和吸光度ΔA标准（y_2，ΔA标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA代入方程得到x_2（nmol/mL）。

2、$NADP^+$和NADPH含量计算

（一）$NADP^+$含量计算

（1） 按液体体积计算：$NADP^+$（nmol/mL）= x_1×（V 提取+V 血清）÷V 血清=11×x_1

（2） 按样本蛋白浓度计算 $NADP^+$（nmol/mg prot）= x_1×V 提取÷(V 提取×Cpr)= x_1 ÷ Cpr

（3） 按样本鲜重计算 $NADP^+$（nmol/g 质量）= x_1×V 提取÷W= x_1÷W

（4） 按细胞数量计算：$NADP^+$（nmol/10^4 cell）= x_1×V 提取÷500=0.002×x_1

（二）NADPH 含量计算

（1） 按液体体积计算：NADPH（nmol/mL）= x_2×（V 提取+V 血清）÷V 血清=11×x_2

（2） 按样本蛋白浓度计算 NADPH（nmol/mg prot）= x_2×V 提取÷(V 提取×Cpr)= x_2 ÷ Cpr

（3） 按样本鲜重计算 NADPH（nmol/g 质量）= x_2×V 提取÷W= x_2÷W

（4） 按细胞数量计算：NADPH（nmol/10^4 cell）= x_2×V 提取÷500=0.002×x_2

V提取：加入提取液体积，1mL；V血清：血清（浆）体积，0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

注意事项：

1、如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三按比例配成混合液。

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 管可以测定 48 个 $NADP^+$或 NADPH。

4、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

实验实例：

1. **$NADP^+$的测定**：称取 0.1g 绿萝叶片，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定= A_2- A_1=0.095-0.066=0.029，标准曲线 y_1=0.5586x+0.0295，根据标曲得出 x_1=0.050，$NADP^+$含量得：$NADP^+$ (nmol/g 质量）= x_1÷W=0.503 nmol/g 质量。

   NADPH 的测定：称取 0.1g 绿萝叶片，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照= A_2'- A_1'=0.101-0.065=0.036，标准曲线 y_2=0.518x+0.0113，根据标曲得出 x_2=0.048，NADPH 含量得：NADPH (nmol/g 质量）= x_2÷W=0.477 nmol/g 质量。

2. **$NADP^+$的测定**：称取 0.1g 大兔肝脏，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定= A_2- A_1=0.307-0.137=0.170，标准曲线 y_1=0.5586x+0.0295，根据标曲得出 x_1=0.295，$NADP^+$含量得：$NADP^+$ (nmol/g 质量）= x_1÷W=2.950 nmol/g 质量。

   NADPH 的测定：称取 0.1g 大兔肝脏，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照= A_2'- A_1'=0.116-0.076=0.040，标准曲线 y_2=0.518x+0.0113，根据标曲得出 x_2=0.055，NADPH 含量得：NADPH (nmol/g 质量）= x_2÷W=0.554 nmol/g 质量。

3. **$NADP^+$的测定**：取 0.1mL 马血清，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定= A_2- A_1=0.068-0.057=0.011，标准曲线 y_1=0.5586x+0.0295，根据标曲得出 x_1=0.019，$NADP^+$含量得：$NADP^+$（nmol/mL）= 11 x_1=0.210 nmol/mL。

   NADPH 的测定：取 0.1mL 马血清，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照= A_2'- A_1'=0.080-0.060=0.020，标准曲线 y_2=0.518x+0.0113，根据标曲得出 x_2=0.017，NADPH 含量得：NADPH （nmol/mL）=11 x_2=0.185 nmol/mL。

标准溶液稀释表

$NADP^+$标准品稀释表

序号	稀释前浓度（nmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（nmol/mL）
1	5000	10	990	50
2	50	100	900	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25
5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125
7	0.3125	200	200	0.15625
8	0.15625	200	200	0.078
9	0.078	200	200	0.039
10	0	0	200	0

NADPH 标准品稀释表

序号	稀释前浓度（nmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（nmol/mL）
1	5000	10	990	50
2	50	100	900	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25
5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125
7	0.3125	200	200	0.15625
8	0.15625	200	200	0.078
9	0	200	200	0