



辅酶 II NADP(H)含量检测试剂盒 (MTT 显色法) 说明书

可见分光光度法

货号: BC1100

规格: 50T/24S

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 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
碱性提取液	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 12mL×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 40 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂六	液体 70 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

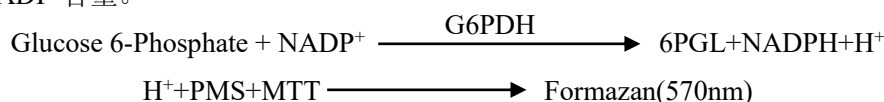
溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 6mL 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) 还原为甲瓩, 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。



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、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、超声破碎仪、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、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°C离心 10min；取上清 200μL，加入等体积碱性提取液；混匀，10000g 4°C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°C离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液；混匀，10000g 4°C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°C离心 10min，取上清 200μL，加入等体积碱性提取液混匀，10000g 4°C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°C离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液混匀，10000g 4°C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 °C离心 10min，取上清液 200uL 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°C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 °C离心 10min，取上清液 200uL 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°C离心 10min，取上清，冰上保存待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，蒸馏水调零。

2、 NADP⁺标准品: 用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.01、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 2.5、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	50	50	-
标准品	-	-	50

试剂五	500	-	-
试剂一	250	250	250
试剂二	75	75	75
试剂三	150	150	150
试剂四	35	35	35
-	-	充分混匀，室温避光静置 20min	
试剂五	-	500	500
充分混匀，静置 5min 后，20000g25°C离心 5min，弃上清，在沉淀中加入			
试剂六	1000	1000	1000

混匀，570nm 下比色，读取吸光值，NADP⁺的记为： $\Delta A_{\text{NADP}^+} = A_2 - A_1$ ，NADPH 的记为 $\Delta A_{\text{NADPH}} = A_2' - A_1'$ ，NADP 标准管的记为 $\Delta A_{\text{NADP 标}} = A_{\text{标}} - A_{\text{空白管}}$ 。NADPH 标准管的记为 $\Delta A_{\text{NADPH 标}} = A_{\text{标}}' - A_{\text{空白管}}$ 。（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： $\text{NADP}^+ (\text{nmol/mL}) = x_1 \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x_1$

(2) 按样本蛋白浓度计算 $\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) = x_1 \div \text{Cpr}$

(3) 按样本鲜重计算 $\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 质量}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div W = x_1 \div W$

(4) 按细胞数量计算： $\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADPH 含量计算

(1) 按液体体积计算： $\text{NADPH} (\text{nmol/mL}) = x_2 \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x_2$

(2) 按样本蛋白浓度计算 $\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) = x_2 \div \text{Cpr}$

(3) 按样本鲜重计算 $\text{NADPH} (\text{nmol/g 质量}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div W = x_2 \div W$

(4) 按细胞数量计算： $\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_2$

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 50 管可以测定 24 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，玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定= $A_2 - A_1 = 0.092 - 0.036 = 0.056$ ，标准曲线 $y_1 = 0.531x + 0.0266$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.055$ ，NADP⁺含量得：
NADP⁺ (nmol/g 质量) = $x_1 \div W = 0.55$ 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，玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定= A 测定- A 对照= $A_2' - A_1' = 0.046 - 0.012 = 0.034$ ，标准曲线 $y_2 = 0.332x + 0.0136$ ，根据标曲得出 $x_2 = 0.061$ ，NADPH 含量得：NADPH (nmol/g 质量) = $x_2 \div W = 0.614$ 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，玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定= $A_2 - A_1 = 0.217 - 0.108 = 0.109$ ，标准曲线 $y_1 = 0.531x + 0.0266$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.155$ ，NADP⁺含量得：
NADP⁺ (nmol/g 质量) = $x_1 \div W = 1.55$ 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，玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定= A 测定- A 对照= $A_2' - A_1' = 0.085 - 0.008 = 0.077$ ，标准曲线 $y_2 = 0.332x + 0.0136$ ，根据标曲得出 $x_2 = 0.191$ ，NADPH 含量得：NADPH (nmol/g 质量) = $x_2 \div W = 1.91$ 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，玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定= $A_2 - A_1 = 0.055 - 0.026 = 0.029$ ，标准曲线 $y_1 = 0.531x + 0.0266$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.005$ ，NADP⁺含量得：NADP⁺ (nmol/mL) = $11 x_1 = 0.050$ 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，玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定= A 测定- A 对照= $A_2' - A_1' = 0.028 - 0.012 = 0.016$ ，标准曲线 $y_2 = 0.332x + 0.0136$ ，根据标曲得出 $x_2 = 0.007$ ，NADPH 含量得：NADPH (nmol/mL) = $11 x_2 = 0.080$ 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	600	1.25
4	1.25	200	200	0.625
5	0.625	200	200	0.3125
6	0.3125	200	200	0.15625
7	0.15625	200	200	0.078
8	0.078	200	200	0.039
9	0.039	200	200	0.0195
10	0.0195	200	200	0.01
11	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