



辅酶II NADP(H)含量检测试剂盒微量法(WST 显色法)

中文名称 : 辅酶II NADP(H)含量检测试剂盒微量法(WST 显色法)

英文名称 : Coenzyme II NADP(H) Content Assay Kit (WST colorimetry)

产品包装 : 盒装

产品规格 : 100T/48S

储存条件 : -20℃

检测方法 : 微量法

有效期 : 6个月

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
碱性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四 A	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四 B	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
NADP 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存
NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20℃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, 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 1.27mL 蒸馏水, 即 5 μ mol/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 μ mol/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。在 1-mPMS 作用下, WST- 1 可与 NADPH 反应, 产生水溶性 formazan, 在 450nm 下有特征吸收峰, 而 NADP⁺可被 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原为 NADPH, 进一步采用 WST- 1 检测。



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)

1、血清(浆)中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

NADP⁺的提取: 取血清(浆)体积(mL): 酸性提取液体积(mL)为 1:5- 10 的比例, (建议取 0.1mL 血清(血浆), 加入 0.5 mL 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 200μL 上清液, 加入 200μL 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

NADPH 的提取: 取血清(浆)体积(mL): 碱性提取液体积(mL)为 1:5- 10 的比例, (建议取 0.1mL 血清(血浆), 加入 0.5 mL 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 200μL 上清液, 加入 200μL 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

2、组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

NADP⁺ 的提取: 建议取 0.1g 组织质量, 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 200μL 上清液, 加入 200μL 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

NADPH 的提取: 建议取 0.1g 组织质量, 加入 0.5 mL 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 200μL 上清液, 加入 200μL 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

3、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, 离心弃上清, 建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 酸性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 停 10s, 重复 30 次), 煮



沸 5min(盖紧, 以防止水分散失), 冰浴冷却后, 10000g , 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

NADPH 的提取: 建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 碱性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 停 10s, 重复 30 次), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g, 4°C离心 10min; 取 200μL 上清液, 加入 200μL 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4°C离心 10min, 取上清,冰上待测。

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 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。
- 2 、NADP⁺标准品: 用蒸馏水稀释为 5 、 2.5 、 1.25 、 0.625 、 0.3125 、 0.15625 、 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 10、 5、 2.5、 1.25、 0.625、 0.3125、 0.15625、 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(A1 、 A1 ')	测定管(A2 、 A2 ')	标准管
样品/标准品	20	20	20
试剂一	200	-	-
试剂一	80	80	80
试剂二	30	30	30
试剂三	30	30	30
试剂四	30	30	30
充分混匀, 室温避光静置 1h			
试剂五	-	200	200



混匀，取 200 μ L 至微量玻璃皿或 96 孔板中，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，每个测定管需设一个对照管)。

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 测定代入方程得到 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 $\Delta A'$ 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⁺含量(nmol/mL) = $x_1 \times (V_{提取} + V_{血清}) \div V_{血清} = 11 \times x_1$

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

C_{pr}

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

(4) 按细胞数量计算：NADP⁺含量(nmol/10⁴ cell) = $x_1 \times V_{提取} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADPH 含量计算

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

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



(3) 按样本鲜重计算 NADPH 含量(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: NADPH 含量(nmol/ 10^4 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 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。同步修改计算公式。

实验实例:

1. NADP⁺的测定: 称取 0.1g 冬青叶片, 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.075 - 0.069 = 0.006$, 标准曲线 $y_1 = 0.2081x - 0.0144$, 根据标曲得出 $x_1 = 0.098$, NADP⁺含量得:

NADP⁺ (nmol/g 质量) = $x_1 \div W = 0.98$ nmol/g 质量。

NADPH 的测定: 称取 0.1g 冬青叶片, 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.155 - 0.110 = 0.045$, 标准曲线 $y_2 = 0.0478x - 0.0188$, 根据标曲得出 $x_2 = 1.335$, NADPH 含量得: NADPH (nmol/g 质量) = $x_2 \div W = 13.35$ nmol/g 质量。

2. NADP⁺的测定: 称取 0.1g 小鼠肝脏, 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 $\Delta A_{\text{测}}$



定=A 测定-A 对照=0.194-0.146=0.048, 标准曲线 $y_1=0.2081x-0.0144$,根据标曲得出

$x_1=0.3$, NADP⁺含量得:

NADP⁺ (nmol/g 质量)= $x_1 \div W=2.999$ nmol/g 质量。

NADPH 的测定: 称取 0.1g 小鼠肝脏, 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=0.170-0.141=0.029, 标准曲线 $y_2=0.0478x-0.0188$,根据标曲得出

$x_2=1$, NADPH 含量得: NADPH (nmol/g 质量) = $x_2 \div W=10$ nmol/g 质量。

3. NADP⁺ 的测定: 取 0.1mL 牛血清, 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 =0.077-0.067=0.010 , 标准曲线 $y_1=0.2081x-0.0144$,根据标曲得出 $x_1=0.117$, NADP⁺含量得:

NADP⁺ (nmol/mL)= $11 \times x_1=1.29$ nmol/mL。

NADPH 的测定: 取 0.1mL 牛血清, 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=0.084-0.072=0.012, 标准曲线 $y_2=0.0478x-0.0188$,根据标曲得出

$x_2=0.644$, NADPH 含量得: NADPH (nmol/mL)= $11 \times x_2=7.088$ 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(μ L)	蒸馏水体积(μ L)	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	0	200	0
---	---	---	-----	---

NADPH 标准品稀释表

序 号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积(μ L)	蒸馏水体积(μ L)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	5000	10	990	50
2	50	100	400	10
3	10	200	200	5
4	5	200	200	2.5
5	2.5	200	200	1.25
6	1.25	200	200	0.625
7	0.625	200	200	0.3125
8	0.3125	200	200	0.156
9	0	0	200	0.039