

辅酶II NADP(H)含量试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

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。利用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原 NADP⁺为 NADPH，从而检测 NADP⁺含量。

所需的仪器和用品

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

试剂的组成和配制

酸性提取液：50mL×1 瓶，4℃ 保存；

碱性提取液：50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 15 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 支，-20℃ 保存，用时加入 4mL 蒸馏水，混匀；用不完的试剂 4℃ 保存一周；

试剂三：粉剂×1 支，-20℃ 保存，用时加入 4mL 蒸馏水，混匀；用不完的试剂 4℃ 保存一周；

试剂四：粉剂×1 支，4℃ 保存，用时加入 4mL 蒸馏水，混匀；用不完的试剂 4℃ 保存一周；

试剂五：液体 1.8mL×1 支，4℃ 保存；

试剂六：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂七：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

NADP⁺和 NADPH 的提取

1 血清（浆）中 NADP⁺和 NADPH 的提取

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。

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：

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℃ 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。

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℃ 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。

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，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（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），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。

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（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），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。

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、临用前将试剂一、二、三和四按以下比例配成混合液，用多少配多少，配制后立即使用

试剂名称(μL)	混合液
试剂一	250
试剂二	75
试剂三	75
试剂四	75

- 3、加样表(在 1.5mL 棕色 EP 管中按下表依次加样)：

试剂名称(μL)	对照管	测定管
样本	50	50
试剂四	475	475
试剂六	500	
试剂五	35	35
充分震荡混匀，室温避光静置 20min		
试剂六		500
充分混匀，静置 5min 后，20000g，25℃离心 5min，弃上清，沉淀中加入：		
试剂七	1000	1000

混匀，570nm 下比色，读取对照吸光值 A1 和测定管吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项

- 1、反应过程中注意避光。
- 2、若 NAD⁺测定中 $\Delta A (A2 - A1) \leq 0.0302$ ，NADH 测定中 $\Delta A (A2 - A1) \leq 0.0222$ ，已低于检测限，可做如下调整：（1）将测定管避光静置时间 20min 延长到 60min；（2）在提取阶段增加取样量，即取 0.2g 样本或 0.2mL 样本加入 1mL 提取液。
- 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 NAD⁺或 NADH。

NADP⁺和 NADPH 含量的计算

(一) NADP⁺含量的计算

标准条件下的回归曲线为 $y = 0.197x + 0.0144$, $R^2 = 0.9998$; 其中 y 为 ΔA , x 为 NADP⁺浓度 nmol/mL

1、血清（浆）中 NADP⁺含量计算

$\text{NADP}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.197 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 101.5 \times (\Delta A - 0.0144)$

2、组织、细菌或细胞中 NADP⁺含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.197 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 5.1 \times (\Delta A - 0.0144) \div Cpr$

(2)按样本鲜重计算

$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.197 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 10.2 \times (\Delta A - 0.0144) \div W$

(3)按细菌或细胞密度计算

$\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.197 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.02 \times (\Delta A - 0.0144)$

(二) NADPH 含量的计算

标准条件下的回归曲线为 $y = 1.2396x + 0.0259$, $R^2 = 0.9977$; 其中 y 为 ΔA , x 为 NADPH 浓度 nmol/mL

1、血清（浆）中 NADPH 含量计算

$\text{NADPH 含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 16.1 \times (\Delta A - 0.0259)$

2、组织、细菌或细胞中 NADPH 含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 0.8 \times (\Delta A - 0.0259) \div Cpr$

(2)按样本鲜重计算

$\text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 1.6 \times (\Delta A - 0.0259) \div W$

(3)按细菌或细胞密度计算

$\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.003 \times (\Delta A - 0.0259)$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V2: 加入提取液体积, 2mL; V3: 加入血清（浆）体积: 0.1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

注意: 最低检测限为 0.01nmol/mL 或 0.01nmol/g 鲜重 或 0.001nmol/mg prot