

NADP/NADPH 检测试剂盒

产品货号: N0036

储存温度: -20°C干燥避光, 有效期一年。NADPH 配制成溶液后, 须适当分装后-80°C保存。所有试剂避免反复冻融。

组分	N0036(100T)
A. NADP+/NADPH 提取液	50mL
B. G6PDH 酶	220uL
C. 显色液	1.1mL
D. NADPH	5mg
E. 反应缓冲液	11mL

产品描述

NADP+/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法) (NADP+/NADPH Assay Kit with WST-8)是一种基于 WST-8 的显色反应, 通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中 NADP+ (氧化型辅酶 II)和 NADPH (还原型辅酶 II)各自的量、比值和总量的检测试剂盒。

NADP+/NADPH 以及 NAD+/NADH 的传统检测方法是检测 NADPH 或者 NADH 在 340nm 处吸收波长的变化, 该方法灵敏度较低并易受样品中有类似紫外吸收物质的干扰, 并且在紫外检测过程中通常需要加大检测样品量以弥补 NADPH 在 340nm 处吸光度过小的不足, 因此该检测方法具有很大的局限性。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品。WST-8 产生的 formazan 都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。并且 WST-8 产生 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。再次, WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定, 使实验结果更加稳定。另外, WST-8 和 MTT、XTT、WST-1 等相比, 线性范围更宽, 灵敏度更高。

本试剂盒使用便捷, 无需分离纯化细胞、组织或其它样品中的 NADP+和 NADPH, 且特异性检测 NADP+和 NADPH, 而不检测 NAD+和 NADH。本试剂盒可以检测含量低至 0.05μM (2.5pmol)的 NADP+或 NADPH, 在 0.05μM (2.5pmol)至 6μM (300pmol)之间呈现良好的线性关系。

NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)是很多氧化还原反应的辅酶, 包括 NADP+(氧化型)和 NADPH (还原型)两种形式。NADP+也参与生物合成反应中,

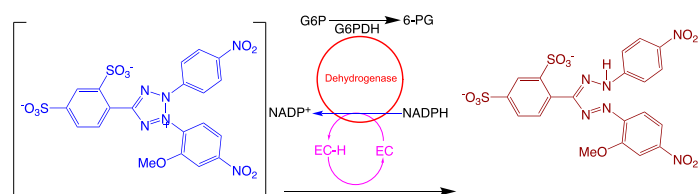
比如脂质和核酸的合成。在动物细胞中, 戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)的氧化阶段是 NADPH 最主要的来源。

本试剂盒可检测样品中的 NADP+、NADPH 以及它们的比值, 具体原理如下:

1) 测定 NADP+/NADPH 的总量: 葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate, G6P)在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)的作用下氧化生成 6-磷酸葡萄糖酸内酯(6-phosphogluconate, 6-PG), 在这一反应过程中 NADP+被还原为 NADPH; 生成的 NADPH 在电子耦合试剂的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan, 在 450nm 左右检测有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中总的 NADP+/NADPH 的总量呈比例关系。WST-8 法检测 NADP+和 NADPH 总量的原理参考图 1。

2) 单独测定 NADPH 的量: 60°C水浴加热 30 分钟后, 样品中 NADP+会分解而只保留 NADPH。NADPH 将 WST-8 还原成 formazan, 通过比色法确定反应生成的 formazan 的量, 最终可以确定样品中 NADPH 的量。

3) 测定 NADP+以及 NADP+/NADPH 比值: 根据前两步检测获得的 NADP+和 NADPH 总量以及 NADPH 的量, 即可得到样品中 NADP+的量以及 NADP+/NADPH 的比值。



使用方法

1. 样品准备

细胞样品 (贴壁细胞或悬浮细胞): 收集约 1×10^6 个细胞, 离心去除培养液, 用预冷的 PBS 清洗细胞, 离心 5min, 弃上清, 加入 200μL 冰浴预冷的 NADP+/NADPH 提取液, 轻轻吹打以促进细胞的裂解, 裂解过程在室温或冰上操作均可。裂解结束后 12,000g, 4°C 离心 5-10min, 取上清备用。

组织样品: 冰上预冷的 PBS 清洗组织后, 称取样品 10-30mg, 用剪刀剪碎, 置于匀浆器中, 加入 400μL NADP+/NADPH 提取液于室温下或冰上进行匀浆, 结束后 12,000g, 4°C 离心 5-10min, 取上清备用。



2. 实验准备

(1) 配制 1mM NADPH 标品：吸取 6ml 超纯水充分溶解本试剂盒提供的 5mg NADPH 后即得到 1mM NADPH 标准品。1mM NADPH 标准品请适当分装后 -80℃ 避光保存。

(2) NADPH 标准曲线的设置：把 1mM 的 NADPH 标准品用 NADP⁺/NADPH 提取液稀释成适当的浓度梯度，如初次检测可以设置 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8μM 这几个浓度，检测时 96 孔板每孔加入 50μL 的标准品，相当于每孔为 0、12.5、25、50、100、200、300、400pmol 的 NADPH。如有必要，在后续的实验中可以根据样品中的 NADPH 含量对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为 0μM 的点为空白对照点，仅含 NADP⁺/NADPH 提取液。

注意：由于 NADPH 很不稳定，故配制后需尽快使用。

(3) G6PDH 酶工作液的配制（现用现配）：用反应缓冲液将 G6PDH 酶稀释 50 倍。例如 2uL G6PDH 加入到 98uL 的反应缓冲液中，即可获得 100uL 的 G6PDH 工作液。检测时，向每个标品或样品中加入 100μL G6PDH 酶工作液。

3. 样品测定

(1) NADP⁺/NADPH 总量测定：吸取 50μL 待测样品于 96 孔板中，设置重复（减少误差）。如样品中的 NADP⁺或 NADPH 含量过高，超出标准曲线的范围，则需用 NADP⁺/NADPH 提取液适当稀释后再进行检测，含量过低时需要加大细胞或组织样品的用量。

(2) 样品中 NADP⁺、NADPH 含量或 NADP⁺/NADPH 比值的测定：向离心管中加入 100-200μL 待测样品，60℃ 水浴或者 PCR 仪上加热 30min 以分解 NADP⁺，如果加热后产生不溶物，10,000g，室温或 4℃ 离心 5min，吸取 50μL 上清至 96 孔板中待测，设置重复。如样品中的 NADP⁺或 NADPH 含量过高，超出标准曲线的范围，则需用 NADP⁺/NADPH 提取液适当稀释后再进行检测，含量过低时需要加大细胞或组织样品的用量。

(3) 在 96 孔板中按照如下方式加样：

	空白对照	标准品	样品
待测样品	-	50μL	50μL
NADP ⁺ /NADPH 提取液	50μL	-	-
G6PDH 酶工作液	100μL	100μL	100μL

(4) 37℃ 避光孵育 10 分钟。说明：此孵育步骤的目的是将样品中的 NADP⁺ 转化为 NADPH；在加入 G6PDH 工作液过程中须轻柔操作，以免产生气泡。若不慎出现气泡，可使用细小的吸头或针头戳破。

(5) 适当混匀显色液，然后每孔加入 10uL 显色液，混匀，37℃ 避光

孵育 10-20 分钟，此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm 处的吸光度。如果显色较浅，也可以适当延长孵育时间至 30-60 分钟，随着孵育时间延长，显色会逐渐加深。

4. 样品中 NADP⁺/NADPH 量的计算：

(1) 计算标准品组中每个点的平均吸光度，减去空白对照组的吸光度，即为各个标准品的吸光度。

(2) 以 NADPH 的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。NADPH 标准品的检测效果请参考图 2。如果孵育时间过长，高浓度标准品的显色会达到平台，此时宜选择未达到平台的标准品来绘制标准曲线，或者选择孵育时间较短的标准品吸光度数据来绘制标准曲线。

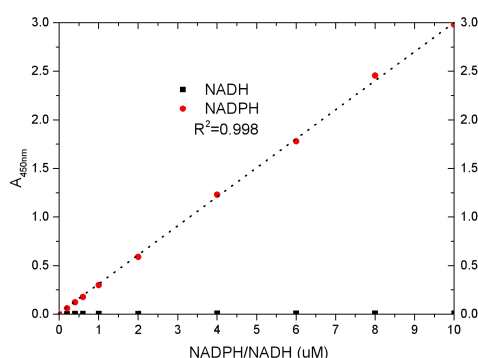


图 2. NADPH 的标准曲线。上图显示本试剂盒可以很好地检测出 NADPH 的含量，并且不会受 NADH 的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

(3) 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的 NADP⁺和 NADPH 总浓度或者 NADPH 的浓度。未 60℃ 加热处理时，计算得到的是样品中 NADP⁺和 NADPH 总量的浓度(NADPtotal)；60℃ 加热处理后，检测得到的是样品中 NADPH 的浓度。

备注：根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出 NADP⁺、NADPH、NADPtotal 的量。

(4) 根据如下计算公式，计算样品中 NADP⁺的量以及 NADP⁺/NADPH 的比值。此时可以把 NADP⁺和 NADPH 总量或各自的含量用单位细胞数量或单位组织重量中的含量来表示。

$$[\text{NADP}^+] = [\text{NADPtotal}] - [\text{NADPH}]$$

$$[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}] = ([\text{NADPtotal}] - [\text{NADPH}])/[\text{NADPH}]$$

(5) 如果希望更加精确地来表述 NADP⁺和 NADPH 总量或各自的含量，可以将样品用 BCA 法测定蛋白浓度。最终用单位蛋白量中 NADP⁺和 NADPH 总量或各自的含量来比较精确地进行表述。





注意事项

- 1) 试剂盒中所有组份均要冷冻保存。如果不是一次用完，为避免反复冻融导致产品失效，请适当分装后保存。
- 2) NADPH 不稳定，取出 NADPH 后请尽快使用。如果发现标准曲线不理想，很可能是标准品发生了降解。
- 3) 由于 NADP⁺/NADPH 提取液本身比较粘稠，以该提取液作为稀释液时，无论对标准品还是样品进行稀释，在稀释过程中务必保证稀释均匀，否则易造成实验数据产生较大波动。
- 4) 在样品加样和混匀过程中，须尽量避免产生气泡，以免影响最终的吸光度测定。
- 5) 如果不能非常严格地控制反应温度和反应时间，每次检测都需要设置标准曲线。
- 6) 如果样品溶液中 NADP⁺和 NADPH 浓度过高或过低，不在试剂盒的线性检测范围内时，可适当调整样品或者提取液的用量。
- 7) 由于 NADP⁺和 NADPH 很不稳定，在冻存过程中较易降解，所以宜尽量使用新鲜样品进行检测。
- 8) 本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。
- 9) 本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！

