

辅酶IINADP(H)含量试剂盒说明书

微量法 100管/48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IINADP(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）还原为甲瓏，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

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

酸性提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

碱性提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体10 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1支，-20℃保存，用时加入3mL蒸馏水，混匀；溶解后4℃保存一周；

试剂三：粉剂×1支，-20℃保存，用时加入3mL蒸馏水，混匀；溶解后4℃保存一周；

试剂四：粉剂×1支，4℃保存，用时加入3mL蒸馏水，混匀；溶解后4℃保存一周；

试剂五：液体3.6mL×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. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至570nm，蒸馏水调零。
2. 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	20	20
试剂一	80	80
试剂二	30	30
试剂三	30	30
试剂四	30	30
试剂五	30	30
试剂六	200	混匀，室温避光静置20min
试剂六		200

充分混匀，静置5min后，20000g，25℃离心5min，弃上清，沉淀中加入：

试剂七	400	400
-----	-----	-----

混匀，取200μL转移至微量石英比色皿或96孔板中，570nm下读取对照吸光值A1和测定管吸光值A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

注意事项

- 1、如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三和四按比例配成混合液。
- 2、对照管和测定管的测定步骤的区别：对照管加完试剂一、二、三、四和五后必须马上加试剂六；测定管加完试剂一、二、三、四和五后必须反应20min后再加试剂六。

3、反应过程中注意避光。

4、若NADP⁺测定中 $\Delta A (A_2-A_1) \leq 0.0144$ ，NADPH测定中 $\Delta A (A_2-A_1) \leq 0.0259$ ，说明样本中辅酶含量较低，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。5、由于每一个测定管需要设一个对照管，本试剂盒100管保证测48个NADP⁺或NADPH。

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 $y = 0.0985x + 0.0144$ ， $R^2 = 0.9998$ ；其中y为 ΔA ，x为NADP⁺浓度nmol/mL

1、血清（浆）中NADP⁺含量计算

$$\text{NADP}^+\text{含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.0985 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 203 \times (\Delta A - 0.0144)$$

2、组织、细菌或细胞中NADP⁺含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+(\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.0985 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 10.2 \times (\Delta A - 0.0144) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+(\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.0985 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 20.3 \times (\Delta A - 0.0144) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0144) \div 0.0985 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.04 \times (\Delta A - 0.0144)$$

（二）NADPH含量的计算

标准条件下的回归曲线为 $y = 0.6198x + 0.0259$ ， $R^2 = 0.9977$ ；其中y为 ΔA ，x为NADPH浓度nmol/mL

1、血清（浆）中NADPH含量计算

$$\text{NADPH含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 0.6198 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 32.3 \times (\Delta A - 0.0259)$$

2、组织、细菌或细胞中NADPH含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH}(\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 0.6198 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 1.6 \times (\Delta A - 0.0259) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADPH}(\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 0.6198 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 3.2 \times (\Delta A - 0.0259) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$\text{NADPH}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0259) \div 0.6198 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.006 \times (\Delta A - 0.0259)$ V₁: 加入反应体系中样本体积，0.02mL；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