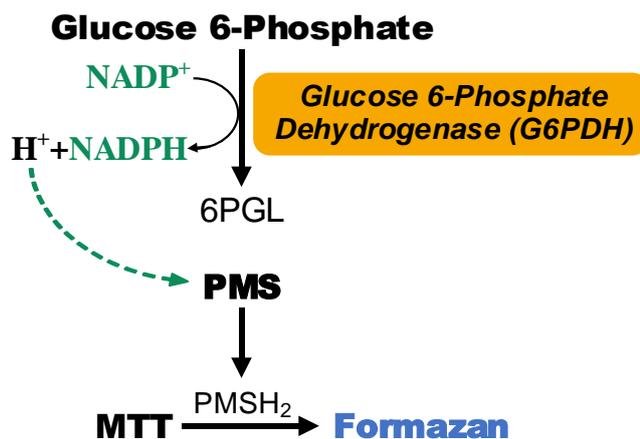




辅酶II NADP (H) 含量检测试剂盒
Coenzyme II NADP (H) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



辅酶II NADP (H) 含量检测试剂盒

Coenzyme II NADP (H) Content Assay Kit

一、产品描述

辅酶II NADP(H) 广泛分布于动物、植物、微生物和培养细胞中，作为还原酶重要辅因子在许多氧化还原相关的代谢反应中发挥递氢作用，能够保护巯基蛋白及酶免受氧化剂损伤。NADPH/NADP⁺ 比值可作为细胞氧化还原态的主要标志之一，在磷酸戊糖途径、合成代谢和抗氧化反应过程中具有重要的调控作用。

通过酸性和碱性提取液分别提取样品中 NADP⁺ 和 NADPH，NADPH 可通过 PMS 的递氢作用，还原氧化型噻唑蓝 (MTT) 生成甲瓖，产物在 570 nm 处具有特征吸收峰；NADP⁺ 可被 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH) 还原为 NADPH，进一步采用 MTT 还原法生成甲瓖，通过吸光值变化即可定量检测辅酶II NADP (H) 的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 80 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 10 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 -20°C 可保存一周)
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 10 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 4°C 可保存一周)
试剂四	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 10 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 4°C 可保存一周)
试剂五	液体 200 μL×1 支	4°C 保存	使用前按试剂五：蒸馏水=1:39 体积比配制 (根据使用量现用现配)
试剂六	液体 50 mL×1 瓶	4°C 保存	-
NADP ⁺ 标准品	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1.27 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NADP ⁺ 标准液)
NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1.2 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NADPH 标准液)

需自备试剂：无水乙醇 (C₂H₆O, MW = 46.07, CAS: 64-17-5)

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、棕色离心管、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴、无水乙醇和蒸馏水。

1. NADP⁺和 NADPH 的提取（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取

NADP⁺的提取：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

NADPH 的提取：按照组织质量（g）：提取液 B 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 B）处理样品，冰浴匀浆，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 A，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

②细菌或细胞中 NADP⁺和 NADPH 的提取

NADP⁺的提取：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

NADPH 的提取：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液 B 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 B）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 A，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

③血清（浆）中 NADP⁺和 NADPH 的提取

NADP⁺的提取：按照血清（浆）体积（mL）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议吸取 0.1 mL 血清（浆），加入 1 mL 提取液 A）处理样品，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

NADPH 的提取：按照血清（浆）体积（mL）：提取液 B 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议吸取 0.1 mL 血清（浆），加入 1 mL 提取液 B）处理样品，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 A，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，蒸馏水调零。

②标准稀释液的制备（现用现配）：使用前分别将 2 μmol/mL NADP⁺标准液和 2 μmol/mL NADPH 标准液使用蒸馏水稀释至 1.25 nmol/mL NADP⁺标准稀释液和 1.25 nmol/mL NADPH 标准稀释液。

序号	A	B	C
稀释前浓度 (nmol/mL)	2000	100	5
标准液体积 (μL)	50	50	250
蒸馏水体积 (μL)	950	950	750
稀释后浓度 (nmol/mL)	100	5	1.25

③助溶剂的配制：按照无水乙醇：蒸馏水=24:1 的体积比配制，充分混匀即为助溶剂。

④在棕色离心管中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 1 (μL)	标准管 2 (μL)	空白管 (μL)
待测样本	20	20	-	-	-
NADP ⁺ 标准稀释液	-	-	20	-	-
NADPH 标准稀释液	-	-	-	20	-
蒸馏水	-	20	-	-	40
试剂一	60	60	60	60	60
试剂二	40	40	40	40	40
试剂三	40	40	40	40	40
试剂四	40	40	40	40	40
试剂五	20	-	20	20	-
充分混匀，室温避光准确反应 20 min					
试剂六	200	200	200	200	200
充分混匀，室温静置 5 min					
15000 g 常温离心 15 min，弃上清，留沉淀					
助溶剂	400	400	400	400	400

吸光值测定：充分振荡使沉淀完全溶解，吸取 200 μL 反应液至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标 (NADP⁺)、A 标 (NADPH) 和 A 空白；计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照，ΔA 标 (NADP⁺)=A 标 (NADP⁺)-A 空白，ΔA 标 (NADPH)=A 标 (NADPH)-A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照管。

3. 辅酶II NADP (H) 含量计算

3.1 NADP⁺含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = \frac{\text{C 标 (NADP}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADP}^+) \times \text{Cpr} \times \text{V 提}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标 (NADP}^+)}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g}) = \frac{\text{C 标 (NADP}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADP}^+) \times \text{W}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{W} \times \Delta\text{A 标 (NADP}^+)}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{\text{C 标 (NADP}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADP}^+) \times \text{Cell}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cell} \times \Delta\text{A 标 (NADP}^+)}$$

④按血清（浆）体积计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mL}) = \frac{\text{C 标 (NADP}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times (\text{V 提} + \text{V 血清}) \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADP}^+) \times \text{V 血清}} = \frac{41.25 \times \Delta\text{A 测定}}{\Delta\text{A 标 (NADP}^+)}$$

3.2 NADPH 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = \frac{\text{C 标 (NADPH)} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADPH)} \times \text{V 提} \times \text{Cpr}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标 (NADPH)}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/g}) = \frac{\text{C 标 (NADPH)} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADPH)} \times \text{W}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{W} \times \Delta\text{A 标 (NADPH)}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{\text{C 标 (NADPH)} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADPH)} \times \text{Cell}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cell} \times \Delta\text{A 标 (NADPH)}}$$

④按血清（浆）体积计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/mL}) = \frac{\text{C 标 (NADPH)} \times \Delta\text{A 测定} \times (\text{V 提} + \text{V 血清}) \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADPH)} \times \text{V 血清}} = \frac{41.25 \times \Delta\text{A 测定}}{\Delta\text{A 标 (NADPH)}}$$

注释： C 标 (NADP⁺) 和 C 标 (NADPH)：NADP⁺和 NADPH 标准稀释液浓度，1.25 nmol/mL；

Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 提：第一次加入提取液的体积，1 mL；3：提取过程中上清液稀释倍

数；V 血清：提取时加入的血清体积，0.1 mL；W：样本质量，g；Cell：细菌或细胞数量，以万计。

四、注意事项

- ①试剂二、试剂三、试剂四配制后有效期较短，为便于试验安排，各附赠一瓶作为备用，每瓶均可满足至少 50 个样本的测定；
- ②2 $\mu\text{mol/mL}$ NADP⁺和 2 $\mu\text{mol/mL}$ NADPH 标准液配制后 4°C可保存 1 周，**严禁-20°C保存**；
- ③实验过程中吸取上清液时应避免吸入沉淀物而影响结果的准确性；
- ④反应时间对实验结果有较大影响建议精确控制，测定样本较多时建议分批进行测定，以避免组内反应时间不一致对结果造成影响；
- ⑤反应体系中试剂不能按比例配制为混合液使用，必须按反应体系顺序依次加入；
- ⑥若 A 测定大于 0.8（96 孔板）或 1.2（微量玻璃比色皿），建议将待测样本适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ⑦为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Note:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

