

辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1097

产品规格: 50管/24样

产品简介:

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。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。

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。

产品内容:

- 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: 基质缓冲液15mL×1瓶, 4℃保存;
- 试剂二: 粉剂×1支, -20℃保存, 用时加入4mL双蒸水, 混匀;
- 试剂三: 粉剂×1支, -20℃保存, 用时加入4mL双蒸水, 混匀;
- 试剂四: 粉剂×1支, 4℃保存, 用时加入4mL双蒸水, 混匀;
- 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。

需自备的仪器和用品:

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

操作步骤:

一、NADP和NADPH的提取:

1. 血清(浆)中NADP和NADPH的提取:

NADP的提取: 取0.1mL血清(浆), 加入0.9mL酸性提取液, 煮沸5min(盖紧); 冰浴冷却后, 10000g, 4℃离心10min; 取上清液, 加入等体积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: 取0.1mL血清(浆), 加入0.9mL碱性提取液, 煮沸5min(盖紧); 冰浴冷却后, 10000g 4℃离心10min; 取上清液, 加入等体积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: 称取约0.1g组织, 加入0.9mL酸性提取液, 冰浴研磨, 煮沸5min(盖紧); 冰浴冷却后, 10000g, 4℃离心10min; 取上清液加入等体积碱性提取液混匀, 10000g, 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

NADPH的提取: 称取约0.1g组织, 加入0.9mL碱性提取液, 冰浴研磨, 煮沸5min(盖紧); 冰浴冷却后, 10000g



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

4℃离心10min；取上清液加入等体积酸性提取液混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

3. 细胞或细菌中NADP⁺和NADPH的提取：

NADP的提取：收集400-500万细胞或细菌，加入0.9mL酸性提取液，超声波破碎1min（强度20%或200W，超声2s，停1s），煮沸5min(盖紧，以防止水分散失)，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，冰上保存待测。

NADH的提取：收集400-500万细胞或细菌，加入0.9mL碱性提取液，超声波破碎1min（强度20%或200W，超声2s，停1s），煮沸5min(盖紧，以防止水分散失)，冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液至另一新的离心管中，加入等体积的酸性提取液使之中和，混匀，冰上保存待测。

二、测定步骤(在1.5mL EP管中按下表依次加样)：

试剂名称	测定孔 (μL)
样本	50
双蒸水	
试剂一	250
试剂二	75
试剂三	75
试剂四	75
试剂五	35
对照管可以只做一个，不需每一个样品都做对照。充分混匀后，室温避光静置40min。	
试剂六	500
充分混匀，静置5min后，20000g，4℃离心5min，弃上清，沉淀中加入：	
试剂七	1000

混匀，570nm下比色。

(一) NADP⁺含量的计算

1. 血清（浆）中NADP⁺含量计算

$$\text{NADP}^+\text{含量}(\mu\text{mol/mL}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 376$$

2. 组织中NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+(\mu\text{mol/g prot}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 37.6 \div \text{样本蛋白浓度}(\text{g/L})$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+(\mu\text{mol/g mass}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 37.6 \div \text{样本鲜重}(\text{g/L})$$

3. 细菌或细胞中NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+(\mu\text{mol/g prot}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 37.6 \div \text{样本蛋白浓度}(\text{g/L})$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 37.6 \div \text{细菌或细胞}(10^4 \text{ cell/L})$$

(二) NADPH含量的计算

1. 血清（浆）中NADPH含量计算

$$\text{NADPH含量}(\mu\text{mol/L}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 855$$

2. 组织中NADPH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH}(\mu\text{mol/g prot}) = (\text{测定管OD值}-0.047) \times 85.5 \div \text{样本蛋白浓度}(\text{g/L})$$

(2) 按样本鲜重计算



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

$\text{NADPH} (\mu\text{mol/g mass}) = (\text{测定管OD值} - 0.047) \times 85.5 \div \text{样本鲜重 (g/L)}$

3. 细胞或细菌中NADPH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$\text{NADPH} (\mu\text{mol/g prot}) = (\text{测定管OD值} - 0.047) \times 85.5 \div \text{样本蛋白浓度 (g/L)}$

(2) 按细菌或细胞密度计算

$\text{NADPH} (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = (\text{测定管OD值} - 0.047) \times 85.5 \div \text{细菌或细胞密度 (} 10^4\text{cell/L)}$

注意事项:

1. 若用比色皿测，沉淀用试剂七溶解后必须立即测。最好加一个测一个。
2. 若用酶标板测，也必须在测定时再加试剂七，加入1000 μL 试剂七溶解沉淀，混匀后，取300 μL 至酶标板中，立即测定。
3. 不可将试剂一、二、三和四混合后再加，必须分开加。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com