

## 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1098

产品规格: 100管/48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<sup>+</sup>和NADPH含量测定可以计算NADP (NADPH + NADP<sup>+</sup>)含量和NADPH/NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>为NADPH, 从而检测NADP<sup>+</sup>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: 液体10mL×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℃避光保存, 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℃避光保存, 用时加入3mL蒸馏水, 混匀; 溶解后4℃保存一周;

试剂五: 液体3.6 mL×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、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和 蒸馏水。

### 操作步骤:

#### 一、NADP<sup>+</sup>和NADPH的提取:

##### 1. 血清(浆)中NADP和NADPH的提取:

NADP<sup>+</sup>的提取: 取血清(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: 取血清(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<sup>+</sup>和NADPH的提取:

NADP<sup>+</sup>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0.1mL血清(浆)),



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

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0.1mL血清(浆), 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<sup>+</sup>和NADPH的提取:

NADP<sup>+</sup>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(10<sup>4</sup>个): 酸性提取液体积(1mL)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, 强度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。

NADH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(10<sup>4</sup>个): 碱性提取液体积(1mL)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, 强度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。

### 二、测定步骤(在1.5mL EP管中按下表依次加样):

试剂名称	对照管(μL)	测管管(μL)
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下读取对照管吸光值A1和测定管吸光值A2, 计算  $\Delta A = A2 - A1$ 。

#### 注意事项:

- 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。
- 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。
- 反应过程中注意避光。
- 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<sup>+</sup>或NADPH。

#### NADP<sup>+</sup>和NADPH含量的计算

##### a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

##### (一) NADP<sup>+</sup>含量的计算

##### 1. 血清(浆)中NADP<sup>+</sup>含量计算

$$\text{NADP}^+\text{含量}(\text{nmol/mL}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 91.4 \times (\Delta A - 0.062)$$



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

## 2. 组织中NADP<sup>+</sup>含量计算

### (1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 4.57 \times (\Delta A - 0.062) \div \text{Cpr}$$

### (2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 9.14 \times (\Delta A - 0.062) \div W$$

### (3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0183 \times (\Delta A - 0.062)$$

## (二) NADPH含量的计算

### 1. 血清(浆)中NADH含量计算

$$\text{NADPH 含量} (\text{nmol/mL}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 144 \times (\Delta A - 0.072)$$

### 2. 组织中NADPH含量计算

#### (1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 7.2 \times (\Delta A - 0.072) \div \text{Cpr}$$

#### (2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 14.4 \times (\Delta A - 0.072) \div W$$

#### (3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0288 \times (\Delta A - 0.072)$$

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: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

## b. 用96孔板测定的计算公式如下

### (一) NADP<sup>+</sup>含量的计算

#### 1. 血清(浆)中NADP<sup>+</sup>含量计算

$$\text{NADP}^+ \text{含量} (\text{nmol/mL}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 182.8 \times (\Delta A - 0.062)$$

#### 2. 组织中NADP<sup>+</sup>含量计算

##### (1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 9.14 \times (\Delta A - 0.062) \div \text{Cpr}$$

##### (2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 18.28 \times (\Delta A - 0.062) \div W$$

##### (3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0366 \times (\Delta A - 0.062)$$

### (二) NADPH含量的计算

#### 1. 血清(浆)中NADH含量计算

$$\text{NADPH 含量} (\text{nmol/mL}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 288 \times (\Delta A - 0.072)$$

#### 2. 组织中NADPH含量计算

##### (1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 14.4 \times (\Delta A - 0.072) \div \text{Cpr}$$

##### (2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 28.8 \times (\Delta A - 0.072) \div W$$

##### (3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0576 \times (\Delta A - 0.072)$$

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: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

**注意: 最低检测限为1nmol/mL或1nmol/g鲜重或0.01nmol/mg prot。**



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