

辅酶 II NADP⁺/NADPH 含量试剂盒说明书

【分光法 24 样(可测 24 个 NADP⁺, 24 个 NADPH)】

一、产品简介:

烟酰胺核苷酸的测定一直是细胞或组织在能量转化和氧化还原状态方面的研究热点。NADP⁺/NADPH 比值不仅是细胞氧化还原态的主要标志之一,而且在生物物质合成和抗氧化代谢中具有重要调控作用。

本试剂盒提供一种方便,快速的检测方法,提供特异性提取液分别提取样品中的 NADP⁺和 NADPH, NADPH 在递氢体作用下与一种高灵敏度的显色剂反应生成黄色水溶性甲瓞,在 450nm 下检测,得到 NADPH 含量。利用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶特异性还原 NADP⁺为 NADPH,从而检测 NADP⁺含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液A	液体60mL×1瓶	4℃保存	
提取液B	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体μL×1支	-20℃保存	用前用1.1mL蒸馏水溶解
试剂二	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前用1.1mL蒸馏水溶解
试剂三	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	EP管1.5mL×1支	4℃保存	
标准品	EP管μg×1支	-20℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、辅酶II NADP⁺/NADPH 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

由于 NADP⁺ 和 NADPH 很不稳定,较易降解,尽量使用新鲜样品进行检测。

1、样本制备(制备完成的 NADP⁺/NADH 待测上清液需尽快检测,以免降解):

① 组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

NADP⁺的提取: 取约 0.1g 组织(水分充足样本可取 0.5g),加入 1mL 提取液 A,冰浴研磨,全部转移到 EP 管中(用提取液 A 补齐到 1mL),植物样本于 95℃ 孵育 5min 或动物样本于 60℃ 孵育 30min,取出后立即冰浴(或放冰箱) 5min; 12000rpm 4℃ 离心 10min; 取 500μL 上清液至新 EP 管中,再加 V1 体积的提取液中和(可分次添加提取液 B,调至 PH 约中性,并记录 V1); 12000rpm, 4℃ 离心 5min,取上清液置于冰上待测。

NADPH的提取: 取约 0.1g 组织(水分充足样本可取 0.5g),加入 1mL 提取液 B,冰浴研磨,全部转移到 EP 管中(用提取液 B 补齐到 1mL),植物样本于 95℃ 孵育 5min 或动物样本于 60℃ 孵育 30min,取出后立即冰浴(或放冰箱) 5min; 12000rpm 4℃ 离心 10min; 取 500μL 上清液至新 EP 管中,再加 V2 体积的提取液中和(可分次添加提取液 A,调至 PH 约中性,并记录 V2); 12000rpm, 4℃ 离心 5min,取上清液置于冰上待测。

【注】:若测出值较低,可加大样本取样量,如增加到 0.2g 等,可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

② 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:取约 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液 A,冰浴研磨,全部转移到 EP 管中(用提取液 A 补齐到 1mL),于 60℃ 孵育 30min,取

出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液至新 EP 管中，再加 V1 体积的提取液中和（可分次添加提取液 B，调至 PH 约中性，并记录 V1）；12000rpm，4℃离心 5min，取上清液置于冰上待测。

NADPH 的提取：先收集细胞或细菌到离心管内：取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 B，冰浴研磨，全部转移到 EP 管中（用提取液 B 补齐 1mL），于 60℃孵育 30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液至新 EP 管中，再加 V2 体积的提取液中和（可分次添加提取液 A，调至 PH 约中性，并记录 V2）；12000rpm 4℃离心 5min，取上清置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至 1000 万等，可做几个梯度选适合本次实验的样本量。

③ 液体中NADP⁺和NADPH的提取：

NADP⁺的提取：取约 0.1mL 液体，加入 1mL 提取液 A，冰浴研磨，全部转移到 EP 管中（用提取液 A 补齐到 1.1mL），于 95℃孵育 5min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液至新 EP 管中，再加 V1 体积的提取液中和（可分次添加提取液 B，调至 PH 约中性，并记录 V1）；12000rpm 4℃离心 5min，取上清置于冰上待测。

NADPH 的提取：取约 0.1mL 液体，加入 1mL 提取液 B，冰浴研磨，全部转移到 EP 管中（用提取液 B 补齐到 1.1mL），于 95℃孵育 5min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液至新 EP 管中，再加 V2 体积的提取液中和（可分次添加提取液 A，调至 PH 约中性，并记录 V2）；12000rpm 4℃离心 5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至 0.5mL 等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

2、 上机检测：

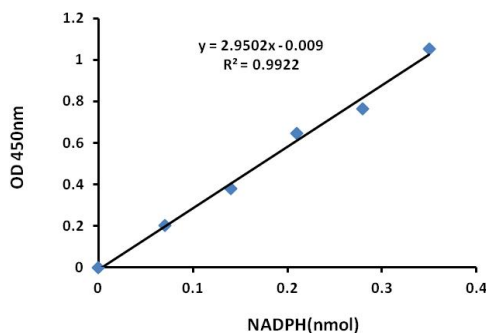
- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，温度设定 37℃，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- ② 在 1mL 玻璃比色皿中按下表依次加入试剂：

试剂名称（μL）	测定管
样本	70
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	560
37℃避光孵育 10min	
试剂四	30
混匀， 37℃条件下，立即在 450nm 处测定吸光值 A1， 30min 后再测定 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 过小，可加大样本取样质量 W；或增加样本量 V1（由 70 增至 120μL，则试剂三相应减少），或延长反应时间（如：60min 或更长）；则改变后的相应变量需代入计算公式重新计算。

五、 结果计算：

- 1、标准曲线的公式： $y = 2.9502x - 0.009$ ；x 是 NADPH 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、NADP⁺含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.009) \div 2.9502] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 9.68 \times (\Delta A + 0.009) \times (0.5 + V_1) \div W \end{aligned}$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.009) \div 2.9502] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 0.019 \times (\Delta A + 0.009) \times (0.5 + V_1) \end{aligned}$$

(3)液体中 NADP⁺含量计算：

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{含量} (\text{nmol/mL}) &= [(\Delta A + 0.009) \div 2.9502] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 96.85 \times (\Delta A + 0.009) \times (0.5 + V_1) \end{aligned}$$

3、NADPH 含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.009) \div 2.9502] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 9.68 \times (\Delta A + 0.009) \times (0.5 + V_2) \div W \end{aligned}$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.009) \div 2.9502] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 0.019 \times (\Delta A + 0.009) \times (0.5 + V_2) \end{aligned}$$

(3)液体中 NADPH 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{NADPH 含量} (\text{nmol/mL}) &= [(\Delta A + 0.009) \div 2.9502] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 96.85 \times (\Delta A + 0.009) \times (0.5 + V_2) \end{aligned}$$

V 样----加入反应体系中样本体积，0.07mL； V 液----所取液体样本体积：0.1mL；

V3---NADP⁺提取液体积：0.5mL 提取液 A+ V1mL 提取液 B= (0.5+V1) mL；

V4---NADPH 提取液体积：0.5mL 提取液 B+ V2mL 提取液 A= (0.5+V2) mL；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 万； NADPH 分子量---745.4；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1 $\mu\text{mol/mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水（NADPH 不太稳定，取出 NADPH 后请尽快使用。如果发现标准曲线不理想，很有可能是标准品发生了降解）。
- 2 把母液稀释成五个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。