

NADP/NADPH 定量试剂盒说明书

NADP/NADPH Quantification Kit

分光光度法

货号: AK302

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
酸性提取液	25mL×1 瓶	4℃保存
碱性提取液	25mL×1 瓶	4℃保存
AK302-A	15 mL×1 瓶	4℃保存
AK302-B	粉剂×1 支	4℃保存, 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀; 溶解后 4℃保存一周
AK302-C	粉剂×1 支	-20℃保存, 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀; 溶解后 4℃保存一周
AK302-D	粉剂×1 支	4℃保存, 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀; 溶解后 4℃保存一周
AK302-E	2mL×1 支	4℃保存
AK302-F	30mL×1 瓶	4℃保存
AK302-G	50mL×1 瓶	4℃保存
AK302-NADP 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存, 临用前加入 1.27 mL 蒸馏水, 即 5 μmol/mL, -20℃可以保存 2 周; 再将其稀释为 1nmol/mL 的 NADP 标准溶液备用
AK302-NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存, 临用前加入 1.2 mL 蒸馏水, 即 5 μmol/mL, -20℃可以保存 2 周; 再将其稀释为 1nmol/mL 的 NADPH 标准溶液备用

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯 (NADP) 是一种酶促辅因子, 参与许多氧化还原反应, 在还原态 (NADPH) 和氧化态 (NADP) 之间循环。NADP 还参与生物合成反应, 如脂质和核酸的合成, 在那里它作为还原剂发挥作用。戊糖磷酸途径 (PPP) 的氧化分支是动物细胞产生 NADPH 的主要来源。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。

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) 还原为甲瓖, 570nm 下检测吸光值, 从而测定 NADPH 含量; 再利用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原 NADP⁺为 NADPH, 进一步采用 MTT 还原法检测 NADP⁺含量。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

NADP⁺和 NADPH 的提取:

1. 血清 (浆) 中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

(1) 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。

(2) 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:

(1) 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。

(2) 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:

(1) 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(10^4 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 1min (冰浴, 强度 20%或 200W, 超声 2s, 停 1s), 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。

(2) 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(10^4 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 1min (冰浴, 强度 20%或 200W, 超声 2s, 停 1s), 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. 分光光度计预热30min 以上, 调节波长至570nm, 蒸馏水调零。
2. 在1.5mL 棕色EP 管中按下表依次加入下列试剂:

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	NADP 或 NADPH 标准管(μL)	空白管(μL)
样本	50	50		
标准品			50	
蒸馏水				50
AK302-A	250	250	250	250
AK302-B	75	75	75	75
AK302-C	75	75	75	75
AK302-D	75	75	75	75
AK302-E	35	35	35	35
AK302-F	500	混匀, 室温避光静置20min		
AK302-F		500	500	500
充分混匀, 静置 5min 后, 20000g, 25℃离心 5min, 弃上清, 沉淀中加入:				
AK302-G	1000	1000	1000	1000

混匀, 570nm 下比色, 读取吸光值, ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, NADP 标准管的记为 ΔA 标准 1=A 标准管 1-A 空白管, NADPH 标准管的记为 ΔA 标准 2=A 标准管 2-A 空白管。(空白管只需做 1-2 次)

注意事项:

1. 对照管和测定管的测定步骤的区别: 对照管加完 AK302-A、B、C、D、E 后必须马上加 AK302-F; 测定管加完 AK302-A、B、C、D、E 后必须反应 20min 后再加 AK302-F。
2. 反应过程中注意避光。
3. 由于每一个测定管需要设一个对照管, 本试剂盒 50 管保证测 24 个 NADP+ 或 NADPH。
4. 最好采用新鲜样本进行测定, 以准确反映该指标含量。

NADP+ 和 NADPH 含量的计算

(一) NADP+含量的计算

1. 血清(浆)中 NADP+含量计算

$$\begin{aligned}\text{NADP+含量 (nmol/mL)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div V \text{ 血清} \\ &= 20 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}\end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADP+含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{NADP+ (nmol/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div (V \text{ 提取} \times C_{pr}) \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div C_{pr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned}\text{NADP+ (nmol/g 鲜重)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div W \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div W\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{NADP+ (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div 500 \\ &= 0.004 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}\end{aligned}$$

(二) NADPH 含量的计算

1. 血清(浆)中 NADPH 含量计算

$$\begin{aligned}\text{NADPH 含量 (nmol/mL)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div V \text{ 血清} \\ &= 20 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}\end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{NADPH (nmol/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div (V \text{ 提取} \times C_{pr}) \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div C_{pr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned}\text{NADPH (nmol/g 鲜重)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div W \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div W\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned}\text{NADPH (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div 500 \\ &= 0.004 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}\end{aligned}$$

注: C 标: NAD 或 NADH 标准溶液的浓度 1nmol/mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; 2: 提取过程中上清液稀释倍数; V 血清: 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。