



辅酶II NADP(H)含量检测试剂盒(微量法)(WST 显色法)

中文名称：辅酶II NADP(H)含量检测试剂盒(WST 显色法)

英文名称：Coenzyme II NADP(H) Content Assay Kit (WST colorimetry)

储存条件：-20°C

产品包装：盒装

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品规格：100T/48S

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
碱性提取液	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 4mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四 A	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂四 B	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
NADP 标准品	粉剂×1 支	-20°C保存
NADPH 标准品	粉剂×1 支	-20°C保存



溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 4mL 蒸馏水充分混匀，溶解后 2-8°C保存 4 周。
- 2、试剂四：临用前将试剂四 A 溶解到试剂四 B 中，分装保存，避免反复冻融，-20°C保存 4 周。
- 3、NADP 标准品：临用前加入 1.27mL 蒸馏水，即 5μmol/mL，-20°C可以保存 2 周。
- 2、4、NADPH 标准品：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，即 5μmol/mL，-20°C可以保存 2 周。

产品说明：

辅酶ⅡNADP(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。在 1-mPMS 作用下，WST- 1 可与 NADPH 反应，产生水溶性 formazan，在 450nm 下有特征吸收峰，而 NADP⁺可被 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原为 NADPH，进一步采用 WST- 1 检测。



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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、超声破碎仪，可调式移液



器、微量玻璃比色皿 /96 孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1、血清(浆)中 NADP⁺和 NADPH 的提取：

NADP⁺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 0.1mL 血清(血浆)，加入 0.5 mL 酸性提取液)，煮沸 5min(盖紧，以防止水分散失)；冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,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 0.1mL 血清(血浆)，加入 0.5 mL 碱性提取液)，煮沸 5min(盖紧，以防止水分散失)；冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,冰上待测。

2、组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取：

NADP⁺ 的提取：建议取 0.1g 组织质量，加入 0.5mL 酸性提取液，冰浴研磨，煮沸 5min(盖紧，以防止水分散失)；冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,冰上待测。

NADPH 的提取：建议取 0.1g 组织质量，加入 0.5 mL 碱性提取液，冰浴研磨，煮沸 5min(盖紧，以防止水分散失)；冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,冰上待测。

3、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，离心弃上清，建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 酸性提取液，超声波破碎(冰浴，功率 200W，超声 3s，停 10s，重复 30 次)，煮



沸 5min(盖紧，以防止水分散失)，冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,冰上待测。

NADPH 的提取：建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 碱性提取液，超声波破碎(冰浴，功率 200W，超声 3s，停 10s，重复 30 次)，煮沸 5min(盖紧，以防止水分散失)；冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清,冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 450nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、NADP⁺标准品：用蒸馏水稀释为 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0nmol/mL 的标准溶液(0nmol/mL 即空白管)。
- 3、NADPH 标准品：用蒸馏水稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0nmol/mL 的标准溶液(0nmol/mL 即空白管)。
- 4、稀释表(附于说明书最后)
- 5、在 EP 管中按顺序加入下列试剂：

试剂名称(μL)	对照管(A1、A1')	测定管(A2、A2')	标准管
样品/标准品	20	20	20
试剂一	200	-	-
试剂一	80	80	80
试剂二	30	30	30
试剂三	30	30	30
试剂四	30	30	30
充分混匀，室温避光静置 1h			
试剂五	-	200	200



混匀，取 200 μ L 至微量玻璃皿或 96 孔板中，读取吸光值，NADP⁺ 的记为： $\Delta A \text{ NADP}^+ = A_2 - A_1$ ，NADPH 的记为 $\Delta A \text{ NADPH} = A_2' - A_1'$ ，NADP 标准管的记为 $\Delta A \text{ NADP 标} = A \text{ 标} - A \text{ 空白管}$ 。NADPH 标准管的记为 $\Delta A \text{ NADPH 标} = A \text{ 标}' - A \text{ 空白管}$ 。(标准曲线只需做 1-2 次，每个测定管需设一个对照管)。

三、NADP⁺和 NADPH 含量计算

1.标准曲线绘制:

(1) NADP⁺标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度(x_1 ，nmol/mL)和吸光度 ΔA 标准(y_1 ， ΔA 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定代入方程得到 x_1 (nmol/mL)。

(2) NADPH 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度(x_2 ，nmol/mL)和吸光度 ΔA 标准(y_2 ， ΔA 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A'$ 代入方程得到 x_2 (nmol/mL)。

2.NADP⁺和 NADPH 含量计算

(一)NADP⁺含量计算

(1) 按液体体积计算：NADP⁺含量(nmol/mL) = $x_1 \times (V \text{ 提取} + V \text{ 血清}) \div V \text{ 血清} = 11 \times x_1$

(2) 按样本蛋白浓度计算 NADP⁺ (nmol/mg prot) = $x_1 \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times Cpr) = x_1 \div$

Cpr

(3) 按样本鲜重计算 NADP⁺含量(nmol/g 质量) = $x_1 \times V \text{ 提取} \div W = x_1 \div W$

(4) 按细胞数量计算：NADP⁺含量(nmol/ 10^4 cell) = $x_1 \times V \text{ 提取} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADPH 含量计算

(1) 按液体体积计算：NADPH 含量(nmol/mL) = $x_2 \times (V \text{ 提取} + V \text{ 血清}) \div V \text{ 血清} = 11 \times x_2$

(2) 按样本蛋白浓度计算 NADPH (nmol/mg prot) = $x_2 \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times Cpr) = x_2 \div Cpr$



(3) 按样本鲜重计算 NADPH 含量(nmol/g 质量)= $x_2 \times V_{\text{提取}} \div W = x_2 \div W$

(4) 按细胞数量计算：NADPH 含量(nmol/ 10^4 cell)= $x_2 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_2$

V 提取：加入提取液体积，1mL；V 血清：血清(浆)体积，0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项：

- 1、如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三按比例配成混合液。
- 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 100 管可以测定 48 个 NADP+ 或 NADPH。
- 4、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。同步修改计算公式。

实验实例：

1. NADP⁺的测定：称取 0.1g 冬青叶片，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.075 - 0.069 = 0.006$ ，标准曲线 $y_1 = 0.2081x - 0.0144$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.098$ ，NADP⁺含量得：

NADP⁺ (nmol/g 质量) = $x_1 \div W = 0.98$ nmol/g 质量。

NADPH 的测定：称取 0.1g 冬青叶片，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.155 - 0.110 = 0.045$ ，标准曲线 $y_2 = 0.0478x - 0.0188$ ，根据标曲得出 $x_2 = 1.335$ ，NADPH 含量得：NADPH (nmol/g 质量) = $x_2 \div W = 13.35$ nmol/g 质量。

2. NADP⁺的测定：称取 0.1g 小鼠肝脏，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 $\Delta A_{\text{测}}$



定=A 测定-A 对照=0.194-0.146=0.048，标准曲线 $y_1=0.2081x-0.0144$,根据标曲得出 $x_1=0.3$ ，NADP⁺含量得：

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div W = 2.999 \text{nmol/g 质量}。$$

NADPH 的测定：称取 0.1g 小鼠肝脏，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算ΔA

测定=A 测定-A 对照=0.170-0.141=0.029，标准曲线 $y_2=0.0478x-0.0188$,根据标曲得出 $x_2=1$ ，NADPH 含量得：NADPH (nmol/g 质量) = $x_2 \div W = 10 \text{ nmol/g 质量}。$

3. NADP⁺ 的测定：取 0.1mL 牛血清，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算 ΔA 测定 =A 测定 -A 对照 =0.077-0.067=0.010，标准曲线 $y_1=0.2081x-0.0144$,根据标曲得出 $x_1=0.117$ ，NADP⁺含量得：

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mL}) = 11 \times x_1 = 1.29 \text{nmol/mL}。$$

NADPH 的测定：取 0.1mL 牛血清，按提取步骤提取后按照测定步骤操作，96 孔板测得吸光值后计算ΔA 测

定=A 测定-A 对照=0.084-0.072=0.012，标准曲线 $y_2=0.0478x-0.0188$,根据标曲得出 $x_2=0.644$ ，NADPH 含量得：NADPH (nmol/mL)= $11 \times x_2 = 7.088 \text{nmol/mL}。$

标准溶液稀释表：

NADP⁺标准品稀释表

序号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	5000	10	990	50
2	50	100	900	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25
5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125
7	0.3125	200	200	0.15625



8	0	0	200	0
---	---	---	-----	---

NADPH 标准品稀释表

序 号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积(μ L)	蒸馏水体积(μ L)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	5000	10	990	50
2	50	100	400	10
3	10	200	200	5
4	5	200	200	2.5
5	2.5	200	200	1.25
6	1.25	200	200	0.625
7	0.625	200	200	0.3125
8	0.3125	200	200	0.156
9	0	0	200	0.039