

NADP⁺/NADPH Assay Kit

NADP⁺/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法)

产品编号	产品名称	规格
BL1432A	NADP ⁺ /NADPH 检测试剂盒(WST-8 法)	100T

产品简介:

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)是很多氧化还原反应的辅酶, 包括 NADP⁺(氧化型)和 NADPH(还原型)两种形式。NADP⁺也参与到生物合成反应中, 比如脂质和核酸的合成。传统的 NAD⁺/NADH 和 NADP⁺/NADPH 测定是通过检测 340 nm 处的吸收来完成的, 该方法灵敏度低且易受干扰。而本试剂盒可以特异性地检测 NADP⁺和 NADPH, 而不检测 NAD⁺和 NADH, 在反应过程中 NADP⁺被还原为 NADPH, NADPH 将 WST-8 还原成橙黄色 formazan (甲贲), 在 450 nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中 NADP⁺或 NADPH 的总量呈比例关系。一次本产品基于 WST-8 的显色反应, 通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中 NADP⁺(氧化型辅酶II)和 NADPH(还原型辅酶II)各自的量、比值和总量的检测试剂盒。

产品组成:

编号	试剂名称	规格
BL1432A-1	G6PDH	220μL
BL1432A-2	显色液	1.1mL
BL1432A-3	NADPH	5mg
BL1432A-4	NADP ⁺ /NADPH 提取液	50mL
BL1432A-5	反应缓冲液	11mL

使用方法:

1. 样品的准备:

- 细胞样品的准备: 对于贴壁细胞, 约 1×10^6 个细胞(大约相当于 6 孔板一个孔长满的细胞数量), 吸净培养液, 用移液器加入 200μL 预冷的 NADP⁺/NADPH 提取液, 并轻轻吹打, 以促进细胞的裂解; 对于悬浮细胞, 约 1×10^6 个细胞, 600g 离心 5 分钟, 吸净培养液, 用移液器加入 200μL 预冷的 NADP⁺/NADPH 提取液, 并轻轻吹打, 以促进细胞的裂解; 裂解过程在室温或冰上操作均可。随后 12,000g, 4°C 离心 5-10 分钟, 取上清作为待测样品备用。
- 组织样品的准备: 冰上预冷的 PBS 洗涤组织后, 称取约 10-30mg 的组织样品, 用剪刀剪碎, 置于匀浆器中, 加入 400μL 的 NADP⁺/NADPH 提取液在室温或冰上进行匀浆。随后 12,000g, 4°C 离心 5-10 分钟, 取上清作为待测样品备用。

2. 试剂盒的准备工作:

- NADPH 标准品的配制: 吸取 6mL 超纯水充分溶解本试剂盒提供的 5mg NADPH 后即得到 1mM NADPH 标准品。1mM NADPH 标准品请适当分装后-80°C 避光保存。
- NADPH 标准曲线的设置: 把 1mM 的 NADPH 标准品用 NADP⁺/NADPH 提取液稀释成适当的浓度梯度, 如初次检测可以设置 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8μM 这几个浓度, 检测时 96 孔板每孔加入 50μL 的标准品, 相当于每孔为 0、12.5、25、50、100、200、300、400pmol 的 NADPH。如有必要, 在后续的实验中可以根据样品中的 NADPH 含量对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为 0μM 的点为空白对照点, 仅含 NADP⁺/NADPH 提取液。
注意: 由于 NADPH 很不稳定, 故配制后需尽快使用。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



(c) G6PDH 工作液的配制: 将 G6PDH 用反应缓冲液稀释 50 倍, 例如 2 μ L G6PDH 加入到 98 μ L 的反应缓冲液中, 即可获得 100 μ L 的 G6PDH 工作液。每个标准品或样品的检测需要使用 100 μ L 的 G6PDH 工作液, 请根据所需检测的标准品和样品的数量, 配制适量的 G6PDH 工作液, 并注意现配现用。

3. 样品测定:

- (a) 样品中 NADP⁺和 NADPH 总量的测定: 吸取 50 μ L 待测样品至 96 孔板中, 为了减少实验误差请设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NADP⁺和 NADPH 的总量过高, 超出标准曲线的范围, 则需要用 NADP⁺/NADPH 提取液将样品适当稀释后再进行检测; 总量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。
- (b) 样品中 NADP⁺、NADPH 的含量或者 NADP⁺/NADPH 比值的测定: 吸取 100-200 μ L 待测样品于离心管中, 60 $^{\circ}$ C 水浴或 PCR 仪上加热 30 分钟以分解 NADP⁺。如果加热后产生不溶物, 则需 10,000g, 室温或 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟, 吸取 50 μ L 上清液作为待测样品至 96 孔板中, 为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NADP⁺或 NADPH 的含量过高, 超出标准曲线的范围, 则需要用 NADP⁺/NADPH 提取液将样品适当稀释后再进行检测; 含量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。
- (c) 请参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、标准品孔和样品孔。加入 G6PDH 工作液后充分混匀。

	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
待测样品	—	50 μ L	50 μ L
NADP ⁺ /NADPH 提取液	50 μ L	—	—
G6PDH 工作液	100 μ L	100 μ L	100 μ L

- (d) 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟。说明: 此孵育步骤的目的是将样品中的 NADP⁺转化为 NADPH; 在加入 G6PDH 工作液过程中须轻柔操作, 以免产生气泡。若不慎出现气泡, 可使用细小的吸头或针头戳破。
- (e) 适当混匀显色液, 然后每孔加入 10 μ L 显色液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10-20 分钟, 此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm 处的吸光度。如果显色较浅, 也可以适当延长孵育时间至 30-60 分钟, 随着孵育时间延长, 显色会逐渐加深。

4. 结果结算

- (a) 计算标准品组中每个点的平均吸光度, 减去空白对照组的吸光度, 即为各个标准品的吸光度。
- (b) 以 NADPH 的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制出标准曲线。NADPH 标准品的检测效果请参考图 1。如果孵育时间过长, 高浓度标准品的显色会达到平台, 此时宜选择未达到平台的标准品来绘制标准曲线, 或者选择孵育时间较短的标准品吸光度数据来绘制标准曲线。

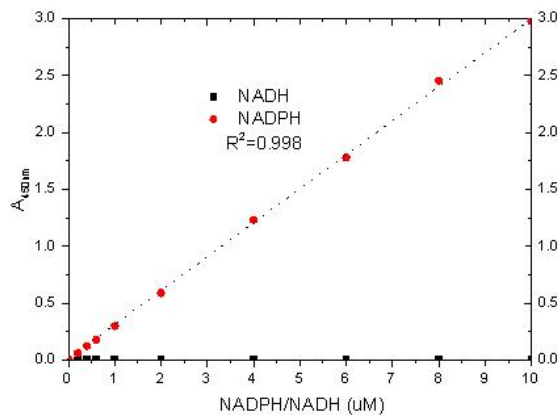


图 1. NADPH 的标准曲线。上图显示本试剂盒可以很好地检测出 NADPH 的含量, 并且不会受

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



NADH 的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- (c) 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的 NADP⁺和 NADPH 总浓度或者 NADPH 的浓度。
未 60°C 加热处理时，计算得到的是样品中 NADP⁺和 NADPH 总量的浓度(NADP_{total})；60°C 加热处理后，检测得到的是样品中 NADPH 的浓度。

备注：根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出 NADP⁺、NADPH、NADP_{total} 的量。

- (d) 根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出 NADP⁺、NADPH、NADP_{total} 的量。

(e) $[NADP^+] = [NADP_{total}] - [NADPH]$

$$[NADP^+]/[NADPH] = ([NADP_{total}] - [NADPH])/[NADPH]$$

- (f) 如果希望更加精确地来表述 NADP⁺和 NADPH 总量或各自的含量，可以将样品用 BCA 法测定蛋白浓度。最终用单位蛋白量中 NADP⁺和 NADPH 总量或各自的含量来比较精确地进行表述。

注意事项：

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：

-20°C 保存 1 年。显色液(BL1432A-2)和 NADPH (BL1432A-3)须-20°C 避光保存。NADPH 配制成溶液后，须适当分装后-80°C 保存。所有试剂避免反复冻融。

