

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01193

产品介绍

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。NADP/NADPH 检测试剂盒是一种基于 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。NADP/NADPH 检测试剂盒能特异性地检测 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 (甲臃), 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 的总量成比例关系。本试剂盒可检测 0.1~10 μM NADP⁺ 或 NADPH。检测原理见图 1:

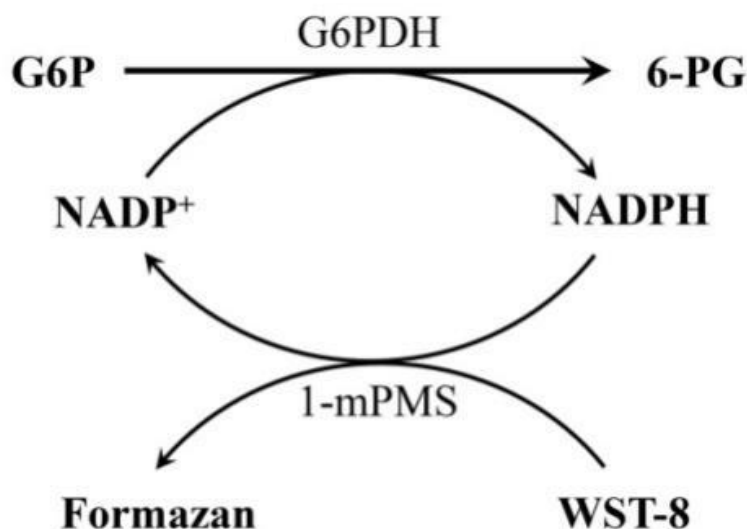


图 1 检测原理图

应用范围

NADP/NADPH 检测、合成代谢指标检测

储运条件

-20 °C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

特异性好: 本试剂盒只检测 NADP/NADPH, 不检测 NAD/NADH;

溶解度高: Formazan 产物的溶解度相较于 MTS、XTT 的产物溶解度更高;

灵敏度高: WST-8 相较于 WST-1 灵敏度更高, 可检测低至 0.1 μM 浓度 NADP⁺ 或者 NADPH;

线性度好: 0.25~10 μM NADPH 保持良好的线性关系。

注意事项

- 1.建议 NADPH 标准品溶解后小量分装保存, 避免反复冻融。
- 2.NADP⁺/NADPH 提取液粘稠, 使用过程中务必保证和待加入的体系充分混匀。
- 3.加样和混匀过程中, 应避免产生气泡影响最终的吸光度检测。
- 4.由于 NADP⁺/NADPH 不稳定, 易降解, 所以尽量使用新鲜样品进行检测。
- 5.本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品和药品, 不得存放于普通住宅内。
- 6.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材
(1) 离心管 (2) 96 孔板
- 2.试剂
(1) 预冷 PBS (2) ddH₂O
- 3.仪器
(1) 酶标仪(测吸光度) (2) 匀浆仪(可选) (3) 离心机

操作步骤

1.样品准备

细胞样品(贴壁细胞或悬浮细胞): 收集约 1×10^6 个细胞, 离心去除培养液, 用预冷的 PBS 清洗细胞, 离心 5 min, 弃上清, 加入 200 μ L 冰浴预冷的 NADP⁺/NADPH 提取液, 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。裂解结束后 12,000 g, 4 °C 离心 5~10 min, 取上清备用。

组织样品: 冰上预冷的 PBS 清洗组织后, 称取样品 10~30 mg, 用剪刀剪碎, 置于匀浆器中, 加入 400 μ L NADP⁺/NADPH 提取液于室温下或冰上进行匀浆, 结束后 12,000 g, 4 °C 离心 5~10 min, 取上清备用。

2.实验准备

(1) 配制 10 mM NADPH 标品: 先将 $10 \times$ NADPH 配制液先用水稀释为 $1 \times$ NADPH 配制液。再吸取 600 μ L $1 \times$ NADPH 配制液加入 D 组分所在的管中, 充分溶解, 得到 10 mM NADPH 标品溶液, 适当分装后置于 -80 °C 冰箱, 避光保存。

(2) 稀释标品: 将 10 mM 的 NADPH 标品用 NADPH 配制液稀释成合适的浓度梯度, 如 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10 μ M, 向 96 孔板中每孔加入 50 μ L 的标准品。如有需要, 可根据样品中 NADPH 的含量适当调整标品浓度范围。

(3) G6PDH 酶工作液的配制(现用现配): 用反应缓冲液将 G6PDH 酶稀释 50 倍。检测时, 向每个标品或样品中加入 100 μ L G6PDH 酶工作液。

3.样品测定

(1) NADP⁺/NADPH 总量测定: 吸取 50 μ L 待测样品于 96 孔板中, 设置重复。如样品中的 NADP⁺ 或 NADPH 含量过高, 超出标准曲线的范围, 则需用 NADPH 配制液适当稀释后再进行检测, 含量过低时应增加样品的用量。

(2) 样品中 NADP⁺、NADPH 含量或 NADP⁺/NADPH 比值的测定: 向离心管中加入 100~200 μ L 待测样品, 60 °C 加热 30 min 以分解 NADP⁺, 如果加热后产生不溶物, 10000 g, 室温或 4 °C 离心 5 min, 吸取 50 μ L 上清至 96 孔板中待测, 设置重复。如样品中的 NADP⁺ 或 NADPH 含量过高, 超出标准曲线的范围, 则需用 NADPH 配制液适当稀释后再进行检测, 含量过低时应增加样品的用量。

(3) 在 96 孔板中按照如下方式加样, 设置空白对照、标准品和样本组, 加入乙醇脱氢酶工作液后充分混匀(加入乙醇脱氢酶工作液过程请轻柔操作, 以免产生气泡; 若不慎产生气泡, 可用枪头戳破)。

试剂	空白对照	标准品	样品
待测样品	-	50 μ L	50 μ L
NADPH 配制液	50 μ L	-	-
G6PDH 酶工作液	100 μ L	100 μ L	100 μ L

(4) 每孔加入 10 μ L 显色液, 充分混匀后, 室温孵育 10~15 min, 测 450 nm 处的吸光度。

注：该操作是将样品中的 NADP+ 通过 G6PDH 酶作用转化成 NADPH, WST-8 与 NADPH 在电子耦合剂的作用下反应生成水溶性甲臍产物。

(5) 数据分析

根据标准曲线计算样品中的 NADP+ 和 NADPH 总浓度或 NADPH 的浓度, 通过样品加入的体积即可计算出 NADP+、NADPH、NADP+/NADPH 总量以及计算出 NADP+/NADPH 的比值 (Ratio)。相关计算公式如下:

$$[\text{NADP}^+] = [\text{NADP}^+/\text{NADPH 总量}] - [\text{NADPH}]$$

$$\text{Ratio}[\text{NADP}^+/\text{NADPH}] = [\text{NADP}^+] / [\text{NADPH}]$$