

辅酶ⅡNADP(H)含量

规格：微量法 48 样

检测波长：450nm

编号：ml300802

检测原理：WST-8 法

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

分别用提取液提取样品中 NADP⁺和 NADPH。在 1-mPMS 作用下，WST-8 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-8 检测。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

酸性提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

碱性提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

NADPH 提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 10 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存，用时加入 1.5mL 水混匀，分装冻存避免反复冻融；

试剂三：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃避光保存；

试剂四：液体 1mL×1 瓶，-20℃避光保存；

标准品 A：粉剂×1 支，-20℃避光保存。

标准品 B：粉剂×1 支，-20℃避光保存。

NADP⁺和 NADPH 的提取:

1 血清 (浆) 中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

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°C水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

NADPH 的提取: 按照血清 (浆) 体积 (mL): NADPH 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取约 0.05mL 血清 (浆), 加入 1mLNADH 碱性提取液), 充分震荡, 60°C水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失); 10000g 4 °C离心 10min; 取上清, 置冰上待测。

2 组织中 NADP⁺和 NADPH 的提取:

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°C水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500 μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

NADPH 的提取: 按照组织质量 (g): NADPH 提取液体积 (mL) 为 1: 5~20 的比例 (建议取约 0.05g 组织, 加入 1mLNADH 提取液), 冰浴研磨, 60°C水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失); 10000g 4 °C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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, 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 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 95°C水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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): NADPH 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mLNADPH 提取液), 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 60°C水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失); 12000g 4 °C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2、**工作液的配制：**临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液

试剂名称 (μL)	工作液
试剂一	100
试剂二	50
试剂三	10

3、样本测定

按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
测定工作液	150
充分混匀，于 450nm 下测定吸光值 A1，37°C 避光 孵育 30min，450nm 下测定吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意事项：

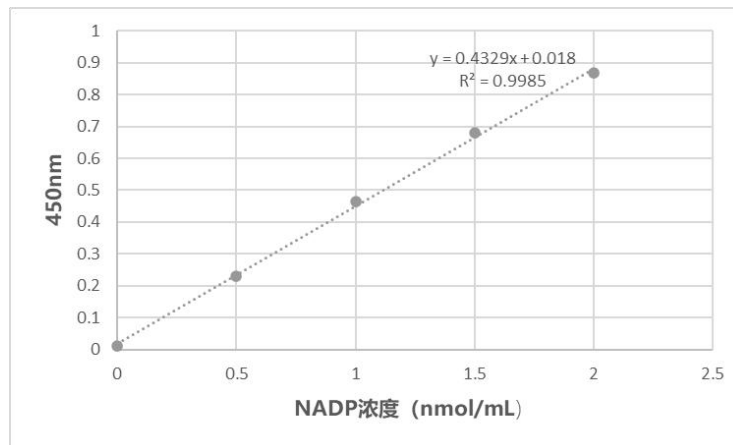
若 ΔA 过小可增加样本量或减少提取液体积，公式中的 W 或 V 应相应改变。

NADP⁺和 NADPH 含量的计算:

(一) NADP⁺含量的计算

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.4329x + 0.018$, $R^2 = 0.9985$;

x 为 NADP (nmol/mL), y 为 ΔA 。



1、血清 (浆) 中 NADP⁺含量计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) \\ &= 46.2 \times (\Delta A - 0.018) \end{aligned}$$

2、组织、细菌或细胞中 NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{ (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \\ &= 2.31 \times (\Delta A - 0.018) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{ (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 4.62 \times (\Delta A - 0.018) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ \text{ (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.018) \div 0.4329 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.009 \times (\Delta A - 0.018) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

V3: 加入血清 (浆) 体积: 0.1mL;

W: 样本质量, g;

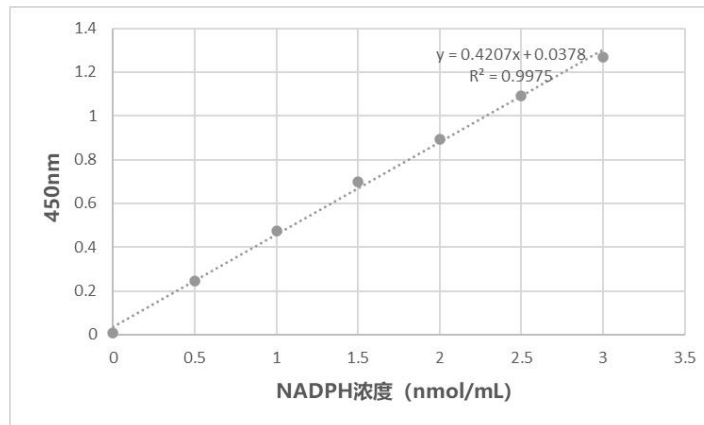
V2: 加入提取液体积, 2mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

500: 细胞或细菌总数, 500 万。

(二) NADPH 含量的计算

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.4207x + 0.0378$, $R^2 = 0.9975$;
x 为 NADPH 浓度 (nmol/mL), y 为 ΔA 。



1、血清 (浆) 中 NADPH 含量计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH 含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) \\ &= 47.54 \times (\Delta A - 0.0378) \end{aligned}$$

2、组织、细菌或细胞中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \\ &= 2.38 \times (\Delta A - 0.0378) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 2.38 \times (\Delta A - 0.0378) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{NADPH (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.005 \times (\Delta A - 0.0378) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

V3: 加入血清 (浆) 体积: 0.05mL;

W: 样本质量, g;

V2: 加入提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

500: 细胞或细菌总数, 500 万。

附：标准曲线制作过程

- 1、制备 NADP 标准品母液 (1 μ mol/mL): 从标准品管 A 中称取 7.4341mg 加入 10mL 蒸馏水得到 10mL 1 μ mol/mL 的 NADP。
- 2、制备 NADPH 标准品母液(1 μ mol/mL): 在标准品管 B 中称取 8.3335mg 加入 10mL 水得到 10mL 1 μ mol/mL NADPH。
- 3、把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3nmol/mL. 也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 4、依据以下测定步骤操作, 根据结果绘制标准曲线。

工作液的配制: 临用前按照样本数量, 按以下比例配制工作液

试剂名称 (μ L)	工作液
试剂一	100
试剂二	50
试剂三	10

按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μ L)	标准管	空白管
标准品	50	-
水	-	50
测定工作液	150	150

充分混匀, 于 450nm 下测定吸光值 A1, 37°C 避光孵育 30min, 450nm 下测定吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

以标准品浓度 (nmol/mL) 为横坐标 (x), 以其对应的吸光值差值 (ΔA) 为纵坐标 (y), 绘制拟合曲线, 替代结果计算中的标准曲线方程;

NADP 标准曲线记为 $y = ax + b$

NADPH 标准曲线记为 $y = cx + d$

NADP 和 NADPH 不稳定, 如果标准曲线不理想, 很有可能是标准品发生了降解。

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。