

改良型 NADP⁺/NADPH 含量检测试剂盒 (WST-8 法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0704	改良型 NADP ⁺ /NADPH 含量检测试剂盒 (WST-8 法)	100T

产品内容

名称	规格	储存条件
NADP+/NADPH 提取液	50mL	-20℃，避光； 避免反复冻融。
NADPH	0.5mg	
G6PDH	200μL	
显色液	1.1mL	
反应缓冲液	10mL	
1、NADPH 标准溶液的配制: 使用 0.6mL 超纯水充分溶解 NADPH, 配制成 1mM NADPH 标准溶液。		
2、NADPH 标准曲线的设置: 用 NADP+/NADPH 提取液将 1mM NADPH 标准溶液梯度稀释为 0μM、0.25μM、0.5μM、1μM、2μM、6μM 几种浓度, 在 96 孔板每孔加入 10μL 标准液, 即每孔标准品含量为 0pmol、2.5pmol、5pmol、10pmol、20pmol、60pmol。 (注: 标准品浓度 0μM 为空白对照, 仅含 NADP+/NADPH 提取液)		
3、G6PDH 工作液的配制: 取适量 G6PDH 母液, 用反应缓冲液将其稀释 50 倍, 制备成 G6PDH 工作液。(注: G6PDH 工作液需现用现配, 每个标准品或样品需要 90μL G6PDH 工作液, 根据所需用量配制)		

一、产品说明

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) 作为辅酶参与到很多氧化还原反应中, 存在氧化型 (NADP⁺) 和还原型 (NADPH) 两种形式。

翼飞雪 NADP⁺/NADPH 检测试剂盒 (WST-8 法) 是无需从样品中纯化 NADP⁺/NADPH, 基于 WST-8 的显色反应, 通过比色法检测细胞、组织或其他样品中氧化型辅酶 II (NADP⁺) 和还原型辅酶 II (NADPH) 各自的含量、比值及总含量的试剂盒。

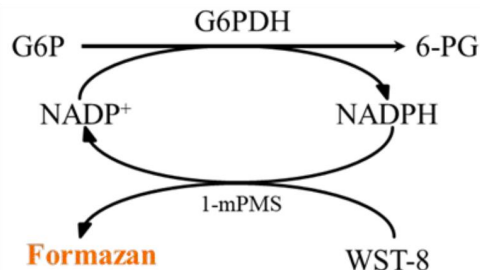
检测原理如下

- 1、检测氧化型辅酶 II (NADP⁺) 和还原型辅酶 II (NADPH) 总量: 葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate, G6P) 在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) 的作用下氧化生成 6-磷酸葡萄糖内酯 (6-phosphogluconate, 6-PG), 这一反应过程中氧化型辅酶 II (NADP⁺) 被还原成还原型辅酶 II (NADPH), 生成的还原型辅酶 II (NADPH) 在电子耦合试剂 1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate) 的作用下将 WST-8 还原成橙黄色的甲臍 (Formazan), 甲臍 (Formazan) 在 450 nm 处有最大吸收峰, 体系中生成甲臍 (Formazan) 的量与氧化型辅酶 II (NADP⁺) 和还原型辅酶 II (NADPH) 总量呈线性关系。
- 2、检测还原型辅酶 II (NADPH) 含量: 样本经过 60℃ 加热 30 min 预处理后, 体系中的氧化型辅酶 II (NADP⁺) 将分解只保留还原型辅酶 II (NADPH), 还原型辅酶 II (NADPH)

将 WST-8 还原成橙黄色的甲臞 (Formazan), 通过比色法确定甲臞 (Formazan) 生成量来确定样品中还原型辅酶 II (NADPH) 含量。

3、检测氧化型辅酶 II (NADP⁺) 含量及氧化型辅酶 II (NADP⁺) 与还原型辅酶 II (NADPH) 比值: 根据前两步检测得出样本中氧化型辅酶 II (NADP⁺) 含量及氧化型辅酶 II (NADP⁺) 与还原型辅酶 II (NADPH) 比值。

WST-8 法检测 NADP⁺/NADPH 总量原理如右图:



二、样品准备

- 1、组织: 用预冷的 PBS 清洗组织, 取 10-30mg 组织样品, 用剪刀剪碎置于匀浆器中, 加入预冷的 400μL NADP⁺/NADPH 提取液, 冰上匀浆, 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清待测。
- 2、贴壁细胞: 取 1×10⁶ 个细胞 (6 孔板单孔长满细胞数量), 尽可能吸除培养液, 加入预冷的 200μL NADP⁺/NADPH 提取液, 冰上轻轻吹打约 10min 使细胞裂解, 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清待测。
- 3、悬浮细胞: 取 1×10⁶ 个细胞, 600g 离心 5min, 尽可能吸除培养液, 加入预冷的 200μL NADP⁺/NADPH 提取液, 冰上轻轻吹打约 10min 使细胞裂解, 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清待测。

三、含量测定

- 1、样品中 NADP⁺/NADPH 总含量的检测: 吸取 50μL 待测样品至 96 孔板中。

注: 为减少实验误差, 建议设置 3-5 个复孔。

- 2、样品中 NADP⁺、NADPH 含量或 NADP⁺/NADPH 比值的检测: 吸取 200μL 待测样品至离心管中, 60℃ 水浴或金属浴加热 30min, 使 NADP⁺ 充分分解。

- 3、参考下表使用 96 孔板设置反应体系:

试剂 (μL)	空白对照	标准品	样品
待测样品	-	10	10
NADP ⁺ /NADPH 提取液	10	-	-
G6PDH 工作液	90	90	90

- 4、37℃ 避光孵育 10min, 使样品中的 NADP⁺ 还原成 NADPH。

- 5、充分混匀显色液, 每孔加入 10μL 显色液并充分混匀, 37℃ 避光孵育 10-20min, 检测 450nm 处的吸光值。

注: 1) 最终检测如出现 NADP⁺ 和 NADPH 总量超过标准曲线范围, 可用 NADP⁺/NADPH 提取液对样品进行适当稀释后再进行检测, 反之如检测总量过低, 则需增加细胞或组织用量。

- 2) 加入 G6PDH 工作液时需轻柔操作, 尽量避免产生气泡, 若出现气泡可用小吸头或针头戳破。

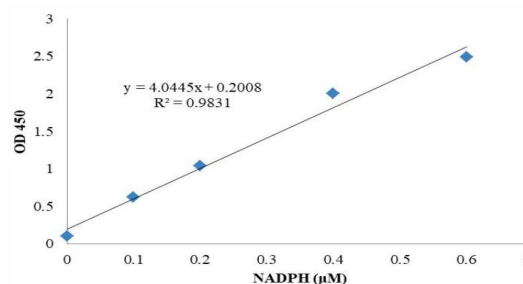
- 3) 加入显色液后如果显色较浅, 可适当延长孵育时间至 30-60min。

- 6、含量的计算:

A. 根据读数计算标准样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. 绘制标准曲线：以 NADPH 浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线（如右图）：

C. 根据标准曲线计算 NADP⁺和 NADPH 总浓度或 NADPH 浓度，其中未经过 60℃ 水浴或金属浴加热处理组，计算得到 NADP⁺和 NADPH 总浓度（NADP⁺+NADPH），经过 60℃ 水浴或金属浴加热处理组，计算得到 NADPH 浓度。



D. 根据检测得到的浓度以及样品的体积及以下公式，计算出 NADP⁺、NADPH 含量、NADP⁺/NADPH 总量（NADP⁺+NADPH）：

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

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

注：1) 可用单位细胞数量或单位组织重量中的含量表示 NADP⁺、NADPH 含量和 NADP⁺/NADPH 总量。

2) 也可通过 BCA 法检测样品中蛋白浓度，最终用单位蛋白量换算 NADP⁺、NADPH 含量或 NADP⁺/NADPH 总量。

四、注意事项

- 1、使用前，将冻存的各组分充分融解并轻轻混匀后再使用。
- 2、NADPH 配制成溶液后，适当分装后-80℃ 储存；如发现标准曲线不理想，有可能是标准品发生了降解。
- 3、NADP⁺/NADPH 提取液比较粘稠，稀释过程中务必保证稀释均匀，否则易造成实验数据不稳定。
- 4、检测过程中，应尽量避免产生气泡，以免影响最终的吸光度值的测定。
- 5、每次检测都要重新绘制标准曲线。
- 6、NADP⁺和 NADPH 不稳定，在冻存过程中容易降解，建议使用新鲜样品进行检测。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。