

NADP⁺/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法)

产品编号: MA1535

规格: 100T

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1535-1 100T	保存条件	有效期	运输条件
G6PDH	220μL	-20℃	自生产之日 12 个月	湿冰运输
显色液	1.1mL	-20℃, 避光		
NADPH	5mg	-20℃, 避光		
NADP ⁺ /NADPH 提取液	50mL	2-8℃		
反应缓冲液	11mL	2-8℃		
说明书	1 份			

产品简介

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) 是生物体内多种氧化还原反应的重要辅酶, 存在氧化型 NADP⁺ 与还原型 NADPH 两种形式。NADP⁺ 参与脂质、核酸等多种物质的生物合成过程。传统 NAD⁺/NADH、NADP⁺/NADPH 的检测方法依靠测定 340 nm 吸光度, 灵敏度较低, 且易受样本杂质干扰。

NADP⁺/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法), 即 NADP⁺/NADPH Assay Kit, 以 WST-8 显色反应为检测原理, 采用比色法, 可测定细胞、组织及其他样本中 NADP⁺ (氧化型辅酶 II)、NADPH (还原型辅酶 II) 的单独含量、二者比值以及总含量。试剂盒特异性强, 仅识别 NADP⁺/NADPH, 不会检测 NAD⁺ 和 NADH。反应时 NADP⁺ 被还原生成 NADPH, NADPH 进一步将 WST-8 还原为橙黄色甲臞 (formazan), 该产物在 450 nm 附近存在最大吸收峰; 体系中甲臞的生成量与样品内 NADP⁺ 或 NADPH 的总量成正比。

使用方法(仅供参考)

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费。

一、样品的准备:

1. 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, $600 \times g$ 离心 5min, 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 $12,000 \times g$, 4℃ 离心 5-10min, 取上清作为待测样品备用。

2. 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 $12,000 \times g$, 4℃ 离心 5-10min, 取上清作为待测样品备用。

二、试剂的准备:

1. 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。【注】粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 小心打开直接加入要求的试剂即可。1mM NADPH 标准品请适当分装后-80℃避光保存。



2. NADPH 标准曲线的设置：将 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、8 μ M，检测时 96 孔板中每孔加入 50 μ L 的标准品，相当于每孔为 0、12.5、25、50、100、200、300、400 pmol 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 0 μ M 的点为空白对照点，仅含 NADP⁺/NADPH 提取液。

【注】由于 NADPH 很不稳定，故配制后的 NADPH 标准梯度需尽快使用。

3. 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。

三、样品测定：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2. 样品中 NADP⁺和 NADPH 的总量的测定：吸取 50 μ L 待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。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。

3. 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℃水浴或 PCR 仪上加热 30min 以分解 NADP⁺。如果加热后产生不溶物，则需 10,000 $\times$ g，室温或 4℃离心 5min，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。

4. 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

5. 37℃避光孵育 10min。

【注】此孵育步骤的目的是将样品中的 NADP⁺转化为 NADPH；在加入 G6PDH 工作液的过程中须轻柔操作，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。

6. 适当混匀显色液，然后每孔加入 10 μ L 显色液，混匀，37℃避光孵育 10-20min，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 30-60min，随着孵育时间延长，显色会逐渐加深。

四、结果计算：

1. 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。

2. 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。



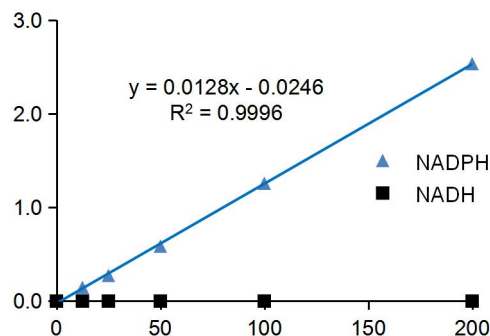


图 1. NADPH 的标准曲线

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 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。

3. 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。未进行 60℃ 加热处理时，检测得到的是样品中 NADP⁺和 NADPH 总量的浓度(NADP total)；60℃ 加热处理后，检测得到的是样品中 NADPH 的浓度。

【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。

4. 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。

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

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

5. 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. 所有试剂开封后请尽快使用，避免反复冻融，以防影响后续实验效果。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

