

辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1098

产品规格: 100管/48样

产品简介:

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。

分别用酸性和碱性提取液提取样品中NADP⁺和NADPH。NADPH通过PMS的递氢作用, 使氧化型噻唑蓝 (MTT) 还原为甲瓚, 570nm下检测吸光值, 从而测定NADPH含量。利用6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原NADP⁺为NADPH, 从而检测NADP⁺含量。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

酸性提取液: 50mL×1瓶, 4℃保存;

碱性提取液: 50mL×1瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体10mL×1瓶, 4℃保存;

试剂二: 粉剂×1支, -20℃保存, 用时加入3mL蒸馏水, 混匀; 溶解后4℃保存一周;

试剂三: 粉剂×1支, -20℃避光保存, 用时加入3mL蒸馏水, 混匀; 溶解后4℃保存一周;

试剂四: 粉剂×1支, 4℃避光保存, 用时加入3mL蒸馏水, 混匀; 溶解后4℃保存一周;

试剂五: 液体3.6 mL×1支, 4℃保存;

试剂六: 液体30mL×1瓶, 4℃保存;

试剂七: 液体50mL×1瓶, 4℃保存。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和 蒸馏水。

操作步骤:

一、NADP⁺和NADPH的提取:

1. 血清(浆)中NADP和NADPH的提取:

NADP⁺的提取: 取血清(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℃水浴5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g, 4℃离心10min; 取500μL上清液, 加入500μL碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g, 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

NADPH的提取: 取血清(浆)体积(mL): 碱性提取液体积(mL)为1: 5-10的比例(建议取约0.1mL血清(浆), 加入1mL碱性提取液), 95℃水浴5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g 4℃离心10min; 取500μL上清液, 加入500μL酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 组织中NADP⁺和NADPH的提取:



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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0.1mL血清（浆），加入1mL酸性提取液），冰浴研磨，95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

NADPH的提取：按照组织质量（g），碱性提取液体积（mL）为1：5-10的比例（建议取约0.1mL血清（浆），加入1mL碱性提取液），冰浴研磨，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取500μL上清液，加入500μL酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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（10⁴个）：酸性提取液体积（1mL）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，强度20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次），95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴中冷却后，10000g，4℃离心10min，取500μL上清液，加入500μL碱性提取液 使之中和；混匀，10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

NADH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（10⁴个）：碱性提取液体积（1mL）为500-1000:1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL碱性提取液），超声波破碎（冰浴，强度20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次），95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴中冷却后，10000g，4℃离心10min，取500μL上清液，加入500μL酸性提取液 使之中和；混匀，10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤(在1.5mL EP管中按下表依次加样)：

试剂名称	对照管（μL）	测管管（μL）
样本	20	20
试剂一	80	80
试剂二	30	30
试剂三	30	30
试剂四	30	30
试剂五	30	30
试剂六	200	混匀，室温避光静置20min
试剂六		200
充分混匀，静置5min后，20000g，25℃离心5min，弃上清，沉淀中加入：		
试剂七	400	400

混匀，取200μL转移至微量石英比色皿或96孔板中，570nm下读取对照管吸光值A1和测定管吸光值A2，计算ΔA=A2-A1。

注意事项：

1. 如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三和四按比例配成混合液。
2. 对照管和测定管的测定步骤的区别：对照管加完试剂一、二、三、四和五后必须马上加试剂六；测定管加完试剂一、二、三、四和五后必须反应20min后再加试剂六。
3. 反应过程中注意避光。
4. 由于每一个测定管需要设一个对照管，本试剂盒100管保证测48个NADP⁺或NADPH。

NADP⁺和NADPH含量的计算

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（一）NADP⁺含量的计算

1. 血清（浆）中NADP⁺含量计算

$$\text{NADP}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 91.4 \times (\Delta A - 0.062)$$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

2. 组织中NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 4.57 \times (\Delta A - 0.062) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 9.14 \times (\Delta A - 0.062) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [4.57 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0183 \times (\Delta A - 0.062)$$

(二) NADPH含量的计算

1. 血清(浆)中NADH含量计算

$$\text{NADPH 含量} (\text{nmol/mL}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 144 \times (\Delta A - 0.072)$$

2. 组织中NADPH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 7.2 \times (\Delta A - 0.072) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 14.4 \times (\Delta A - 0.072) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [7.2 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0288 \times (\Delta A - 0.072)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2: 加入提取液体积, 2mL; V3: 加入血清(浆)体积, 0.1mL;
Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

b. 用96孔板测定的计算公式如下

(一) NADP⁺含量的计算

1. 血清(浆)中NADP⁺含量计算

$$\text{NADP}^+ \text{含量} (\text{nmol/mL}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 182.8 \times (\Delta A - 0.062)$$

2. 组织中NADP⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 9.14 \times (\Delta A - 0.062) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 18.28 \times (\Delta A - 0.062) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADP}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [9.14 \times (\Delta A - 0.062) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0366 \times (\Delta A - 0.062)$$

(二) NADPH含量的计算

1. 血清(浆)中NADH含量计算

$$\text{NADPH 含量} (\text{nmol/mL}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 288 \times (\Delta A - 0.072)$$

2. 组织中NADPH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/mg prot}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 14.4 \times (\Delta A - 0.072) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 28.8 \times (\Delta A - 0.072) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH} (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = [14.4 \times (\Delta A - 0.072) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0576 \times (\Delta A - 0.072)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2: 加入提取液体积, 2mL; V3: 加入血清(浆)体积, 0.1mL;
Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

注意: 最低检测限为1nmol/mL或1nmol/g鲜重或0.01nmol/mg prot。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com