

# 产品说明书

## NADP/NADPH 检测试剂盒

产品货号: N6036

产品规格: 100T

产品内容:

组分	N6036 (100T)
A. NADP <sup>+</sup> /NADPH 提取液	50 mL
B. G6PDH 酶	220 $\mu$ L
C. 显色液	1.1 mL
D. NADPH	5 mg
E. 10 $\times$ NADPH 配制液	5 mL
F. 反应缓冲液	11 mL

### 储存条件

-20 $^{\circ}$ C避光保存, 有效期见外包装。

### 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<sup>+</sup>(氧化型)和 NADPH(还原型)两种形式。NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>/NADH 和 NADP<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>(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<sup>+</sup>和 NADPH, 而不检测 NAD<sup>+</sup>和 NADH, 在反应过程中 NADP<sup>+</sup>被还原为 NADPH, NADPH 将 WST-8 还原成橙黄色 formazan (甲臜), 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<sup>+</sup>或 NADPH 的总量呈比例关系。本试剂盒可检测 0.1  $\mu$ M-10  $\mu$ M NADP<sup>+</sup>或

NADPH。

### 使用方法

#### 1. 样品准备

细胞样品(贴壁细胞或悬浮细胞): 收集约  $1 \times 10^6$  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  $\mu$ L 冰浴预冷的 NADP<sup>+</sup>/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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ L NADP<sup>+</sup>/NADPH 提取液于室温下或冰上进行匀浆, 结束后 12,000 g, 4 $^{\circ}$ 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  $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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  $\mu\text{M}$ ，向 96 孔板中每孔加入 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  G6PDH 酶工作液。

### 3. 样品测定

(1) NADP<sup>+</sup>/NADPH 总量测定：吸取 50  $\mu\text{L}$  待测样品于 96 孔板中，设置重复。如样品中的 NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>、NADPH 含量或 NADP<sup>+</sup>/NADPH 比值的测定：向离心管中加入 100-200  $\mu\text{L}$  待测样品，60 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min 以分解 NADP<sup>+</sup>，如果加热后产生不溶物，10000 g，室温或 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，吸取 50  $\mu\text{L}$  上清至 96 孔板中待测，设置重复。如样品中的 NADP<sup>+</sup>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：

	空白对照	标准品	样品
--	------	-----	----

待测样品	-	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
NADPH 配制液	50 $\mu\text{L}$	-	-
G6PDH 酶工作液	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

(4) 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  显色液，充分混匀后，室温孵育 10-15 min，测 450 nm 处的吸光度。

(5) 数据分析。根据标准曲线计算样品中的 NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>、NADPH、NADP<sup>+</sup>/NADPH 总量。

### 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<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>/NADPH 不稳定，易降解，所以尽量使用新鲜样品进行检测。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

