



NADP⁺/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法)

NADP⁺/NADPH Assay Kit (WST-8)

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0004	NADP ⁺ /NADPH 提取液	50 mL
	NADPH	0.5 mg
	G6PDH	200 μ L
	显色液	1.1 mL
	反应缓冲液	10 mL
	说明书	1 份

产品简介

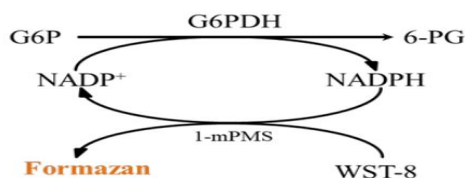
NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)是很多氧化还原反应的辅酶, 包括 NADP⁺ (氧化型) 和 NADPH (还原型)两种形式。

默科的 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 还原成橙黄色的甲臍 (Formazan), 通过比色法确定甲臍 (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 总量原理图

保存条件

-20℃ 保存, 有效期 1 年。避光保存。避免反复冻融。

注意事项

- 使用前, 将冻存的各组分充分融解并轻轻混匀后使用。
- NADPH 配制成溶液后, 适当分装后 -80℃ 保存。NADPH 不稳定, 如果发现标准曲线不理想, 很有可能是标准品发生了降解。
- 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产生较大波动。
- 在检测过程中, 应尽量避免产生气泡, 以免影响最终的吸光度测定。
- 建议每次检测都重新绘制标准曲线。
- NADP⁺ 和 NADPH 不稳定, 在冻存过程中较易降解, 建议使用新鲜样品进行检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。



使用说明

1. 反应液准备

(1) NADPH 标准溶液配制: 0.5 mg NADPH 用 0.6 mL 超纯水溶解, 配制成 1 mM NADPH 标准溶液。

(2) NADPH 标准曲线设置: 用 NADP⁺/NADPH 提取液将 1 mM NADPH 梯度稀释为 0 μM、0.25 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM、6 μM 几个浓度, 对于 96 孔板每孔加入 10 μL 标准品, 即每孔标准品含量为 0 pmol、2.5 pmol、5 pmol、10 pmol、20 pmol、60 pmol。其中标准品浓度为 0 μM 为空白对照, 仅含 NADP⁺/NADPH 提取液。

(3) G6PDH 工作液配制: 每个标准品或样品需要 90 μL G6PDH 工作液, 根据实验样品取适量 G6PDH 用反应缓冲液将其稀释 50 倍。

注: ①由于 NADPH 不稳定, 需现配现用, 建议 NADPH (1 mM) 溶液适当分装并避光储存, -80℃ (半年) 或 -20℃ (两个月)。②请适量配制 G6PDH 工作液并现配现用。

2. 样品准备

细胞样品准备:

(1) 贴壁细胞: 取 1×10^6 个细胞 (6 孔板单孔长满细胞量), 吸净培养液, 加入预冷 200 μL NADP⁺/NADPH 提取液, 轻轻吹打使细胞裂解。

悬浮细胞: 取 1×10^6 个细胞, 600 g 离心 5 min, 吸净培养液, 加入预冷 200 μL NADP⁺/NADPH 提取液, 轻轻吹打使细胞裂解。

(2) 裂解过程 10 min 左右, 裂解过程在室温或冰上操作均可。

(3) 4℃ 12,000 g 离心 5-10 min, 取上清即为待测样品。

组织样品准备:

(1) 组织样品用预冷 PBS 清洗, 取 10-30 mg 组织样品, 用剪刀剪碎并置于匀浆器中, 加入预冷 400 μL NADP⁺/NADPH 提取液在室温或冰上进行匀浆。

(2) 4℃ 12,000 g 离心 5-10 min, 取上清即为待测样品。

3. 检测

(1) 样品中 NADP⁺/NADPH 总量检测: 吸取 10 μL 待测样品至 96 孔板中, 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 比值检测: 吸取 200 μL 待测样品至离心管中, 60℃ 水浴或金属浴加热 30 min 使 NADP⁺充分分解。

(3) 参考下表使用 96 孔板设置反应体系。

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

(4) 37℃避光孵育 10 min。孵育的目的是将样品中的 NADP⁺还原成 NADPH。

(5) 混匀显色液, 每孔加 10 μL 显色液并混匀, 37℃避光孵育 10-20 min。加入显色液后反应即开始, 橙黄色甲臌 (Formazan) 开始生成, 检测 450 nm 处的吸光度。

注: ①如发现样品中 NADP⁺和 NADPH 总量过高超出标准曲线范围, 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。

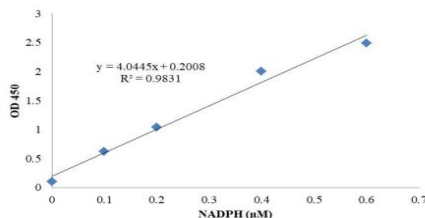
②在加入 G6PDH 工作液过程中必须轻柔操作, 以免产生气泡, 若出现气泡可用小枪头或针头戳破。

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, 延长孵育时间, 颜色会加深。

4. 计算

(1) 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。

(2) 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 (如下图)。



(3) 根据标准曲线计算细胞、组织样品中 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。

(4) 根据检测得到的浓度及样品的体积及以下公式, 计算出 NADP⁺、NADPH 含量和 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可以用单位细胞数量或单位组织重量中的含量来表示 NADP⁺、NADPH 含量和 NADP⁺/NADPH 总量。

②也可以通过 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。