天净沙系列

CAT#: 7-SC193149-74-5

低温运输，-20℃保存

天净沙

NADP+/NADPH 浓度测定试剂盒

NADP+/NADPH Assay Kit

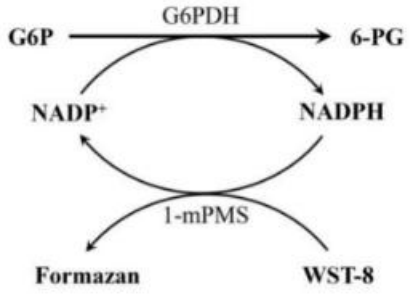
使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是用于检测 NADP+/NADPH 浓度的试剂盒。其原理是葡萄糖-6-磷)在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的作用下氧化生成 6-磷酸葡萄糖酸内酯，同时 NADP+被还原为 NADPH;生成的 NADPH 在电子耦合试剂 1-mPMS 的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的甲臜 formazan，反应体系中生成的甲臜与样品中 NADP+和 NADPH 的总量相关，因此通过测定甲臜的浓度可以推测 NADP+和 NADPH 的总量。如果将样本在 60°C 水浴加热 30 分钟将 NADP+分解，则测定的只是 NADPH 的量，通过总量减去 NADPH 就得到 NADP+的量，就可以计算得到 NADP+/NADPH 的比值。本反应原理图如下:



本产品有如下特点:

1. 操作简单快捷。
2. 即开即用，用户不用单独准备各种试剂。
3. 提供 NADPH 阳性对照溶液，便于在遇到问题时分析原因。
4. 适用于检测从各种材料中提取的 NADP+/NADPH 样本。
5. 检测的线性范围是 XX mM 至 XXX μM，检测下限是 X μM。
6. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
NADP+/NADPH 浓度测定反应液	7-SC193149-74-5r	120 mL	120 mL 棕色瓶
NADP+/NADPH 浓度测定显色液	7-SC193149-74-5c	1.1 mL	1.5 mL 棕色管
NADPH 干粉	CAS:2646-71-1	100 T	1.5 mL 本色管
使用手册	sc7-SC193149-74-5	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存。有效期一年。

自备物品

超纯水、分光光度计

使用方法

一、首次使用本试剂盒时试剂的配制

1. 配置 1 mM NADPH 阳性对照溶液：在装有 NADPH 干粉的瓶中加入 10 mL 自备超纯水，颠倒摇晃 20 次溶解得到 1 mM NADP+/NADPH 阳性对照溶液。没用完的此溶液需要-20℃保存。
2. 用自选方式制备待测样本，样本溶于水或碳酸盐缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 7.8。

二、标准曲线梯度稀释液的制备

3. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。
4. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。
5. 将第 1 步制备的 1 mM NADPH 阳性对照溶液为 1 号管样品。
6. 2 号管中加入 0.7 mL 在第 1 步制备的 1 mM NADPH 阳性对照溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM NADPH 溶液。放冰上待用。
7. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 0.5 mM NADPH 溶液(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 250 μM NADPH 溶液。放冰上待用。
8. 重复上面的操作直到得到 1 mM、0.5 mM、250 μM、125 μM、62.5 μM、31.25 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

三、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

9. 假设有 N 个样本，每个样本做一次重复，则标记 N+7 个 1.5 mL 离心管，其中 N 个用于待测样本，多出的 6 个用于标准曲线制备，另外一个用做阴性对照。
10. 如果测定样品中 NADP+和 NADPH 的总量：立即进入第 12 步。
11. 如果测定样品中 NADP+、NADPH 的含量或者两者的比值:吸取 100-200 mL 待测样品于离心管中，60°C 加热 30 分钟，10,000×g 室温离心 5 分钟，立即进入第 12 步。
12. 按下表在各管中加入各成分。根据分光光度计一次可以同时测定的样本数决定每次加几个样本:

成分	N 个样本管	阴性对照	6 个标曲管
NADP+/NADPH 浓度测定反应液	各 860 μL	860 μL	860 μL
N 个待测样本	各 100 μL	不加	不加
第 8 步所得 6 个样	不加	不加	各 100 μL 分别到对应的管

37°C 避光孵育 10 分钟			
NADP+/NADPH 浓度测定显色液	各 40 μL	40 μL	40 μL
37°C 避光孵育 10-20 分钟			

13. 然后使用分光光度计测定每个样本在 450 nm 的光吸收读数，测前用超纯水调零，共得 N+7 个读数，如果显色较浅，也可以适当延长孵育时间至 30-60 分钟，随着孵育时间延长，显色会逐渐加深。

四、数据处理

14. 计算真实 OD450 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数。
15. 制备标准曲线：以 NADPH 溶液的浓度为横轴，以其真实 OD450 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。
16. 将 N 个待测样品的 OD450 值带入标准曲线方程，即可计算出每个待测样品中的 NADP+和 NADPH 总浓度。如果样本经过 60°C 加热处理，计算得到的是样品中 NADPH 的浓度。
17. 根据如下公式计算样品中 NADP+的量以及 NADP+/NADPH 的比值。

$$[NADP+] = [NADP_{total}] - [NADPH]\ [NADP+]/[NADPH]$$

$$= ([NADP_{total}] - [NADPH])/[NADPH]$$

18. 此时可以把 NADP+和 NADPH 总量或各自的含量用单位细胞数量或单位组织重量中的含量来表示。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。
19. 如果样品溶液中 NADP+和 NADPH 浓度过高或过低，不在试剂盒的线性检测范围内时，可适当调整样品或者提取液的用量。

四、多孔板酶标仪检测

20. 同上，只是所有反应体系按比例缩小使得终体积跟酶标用多孔板板兼容，最后在 X nm 测定光吸收。

关联产品	还原型辅酶 II 含量测定试剂盒