

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K803-M

产品规格: 96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(450 nm)

Elabscience[®] NADP⁺/NADPH 比色法试剂盒 (WST-8 法)

NADP⁺/NADPH Colorimetric Assay Kit (WST-8)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织和细胞样本中 NADP⁺(氧化型辅酶 II)和 NADPH(还原型辅酶 II)各自的含量、比值和总含量。

检测原理

测定 NADP⁺和 NADPH 总量:

葡萄糖-6-磷酸(G6P)在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的作用下氧化生成 6-磷酸葡萄糖酸内酯(6-PG), 在这一反应过程中 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 formazan, 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⁺和 NADPH 的总量呈比例关系。

单独测定 NADPH 的量:

样本提取后, 60°C 水浴加热 30 分钟, 样本中的 NADP⁺会分解而只保留 NADPH。NADPH 将 WST-8 还原成 formazan, 通过比色法确定生成的 formazan 的量, 最终可以单独测定样本中 NADPH 的量。

测定 NADP⁺以及 NADP⁺/NADPH 的比值:

根据前两步检测获得的 NADP⁺和 NADPH 总量以及 NADPH 单独的量, 即可得到样本中 NADP⁺的量以及 NADP⁺/NADPH 的比值。

在上述测定过程中, NAD⁺和 NADH 对测定结果无影响。

本试剂盒检测样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL×2 瓶	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	12 mL×1 瓶	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.2 mL×2 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	NADPH 标准品 (NADPH Standard)	粉剂×1 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(450 nm)，恒温水浴锅、37 ℃ 恒温箱

试剂：超纯水

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液配制：

每支试剂四粉剂用0.12 mL的超纯水充分溶解，临用前按需配制，分装后-20℃避光可保存2天。

③ 反应工作液的配制：

将试剂四应用液与试剂二按体积比为1:49的比例混匀，临用前按需配制，配制后避光保存。

④ 1 mmol/L NADPH标准品的配制：

每支试剂五用4.8 mL超纯水充分溶解得1 mmol/L NADPH标准品，临用前配制，分装后-20℃可避光保存7天。

⑤ 10 μmol/L NADPH标准品溶液的配制：

按照1 mmol/L NADPH标准品：试剂一按体积比为1:99的比例稀释100倍，即得10 μmol/L标准品，临用前按需现配现用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0
10 μmol/L 标准品(μL)	0	50	75	100	125	150	200	250
试剂一(μL)	500	450	425	400	375	350	300	250

样本准备

① 样本处理

细胞样本：对于贴壁细胞，吸弃培养液，用冰上预冷的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)将细胞洗一遍。用细胞刮刮下细胞，加入 2-5 mL 冰上预冷的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)，4 ℃，1000 × g 离心 10 min 收集细胞，按照 4×10^6 个细胞加入 0.8 mL 冰浴预冷的试剂一，轻轻吹打后，静置 10 min 以裂解细胞；对于悬浮细胞，取约 4×10^6 个细胞，4 ℃，600 × g 离心 5 min，吸净培养液弃上清，用移液器加入 0.8 mL 冰浴预冷的试剂一，轻轻吹打后，静置 10 min 以裂解细胞；裂解过程在室温或冰上操作均可。最后 4 ℃，12000 × g 离心 10 min，取上清液待测。

组织样本：匀浆介质为试剂一，4 ℃，12000 × g 离心 10 min，取上清液待测。

组织和细胞的匀浆液中含有能分解 NADPH 的酶，建议在样本提取离心后，将上清液用 10 KD 超滤管过滤，以除去分解酶。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.02-5.0 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
Jurkat 细胞	不稀释	293T 细胞	不稀释
Mark 细胞	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
HCT116 细胞	不稀释	Hela 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 尽量选用新鲜的样本进行测定。

② 样本提取液经 60 ℃ 水浴加热 30 分钟后，如有浑浊，可 4 ℃，10000 × g 离心 10 min 后，取上清液再测定。

操作步骤

样本前处理:

测定 NADP⁺和 NADPH 总量时, 取超滤管过滤后的待测样本上清液直接测定。

如要单独测定 NADPH 的量, 可取超滤管过滤后的待测样本上清液 0.2 mL 于 EP 管中, 60 °C 水浴 30 min, 流水冷却后待测。

- ① 测定孔: 取 50 μ L 待测样本上清液, 加入到酶标板对应的测定孔中。
标准孔: 取 50 μ L 不同浓度标准品, 加入到酶标板对应的标准孔中。
- ② 取 100 μ L 反应工作液加入到步骤①中的测定孔和标准孔中。
- ③ 酶标仪上振板 5 s, 然后 37 °C 恒温箱中准确孵育 10 min。
- ④ 孵育结束后, 立即向测定孔和标准孔中加入 20 μ L 的试剂三。
- ⑤ 酶标仪上振板 5 s, 37 °C 恒温箱中孵育 10 min 后, 波长 450 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
待测样本上清液(μ L)	--	50
不同浓度标准品(μ L)	50	--
反应工作液(μ L)	100	100
酶标仪上振板 5 s, 然后 37 °C 恒温箱中准确孵育 10 min		
试剂三(μ L)	20	20
酶标仪上振板 5 s, 37 °C 恒温箱中孵育 10 min 后, 波长 450 nm 处测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

样本中 NADP⁺和 NADPH 总量的计算公式:

$$[\text{NADP}]_{\text{total}} (\mu\text{mol/gprot}) = (\Delta A_1 - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

样本中 NADPH 含量的计算公式:

$$[\text{NADPH}] (\mu\text{mol/gprot}) = (\Delta A_2 - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

样本中 NADP⁺含量的计算公式:

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

样本中 NADP⁺与 NADPH 的比值计算公式:

$$[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}] = ([\text{NADP}]_{\text{total}} - [\text{NADPH}])/[\text{NADPH}] \times 100\%$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_1 : 测定 NADP⁺和 NADPH 总量时样本测定 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2 : 单独测定 NADPH 时样本测定 OD 值-空白 OD 值

C_{pr} : 超滤管过滤前的上清液蛋白浓度(gprot/L)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

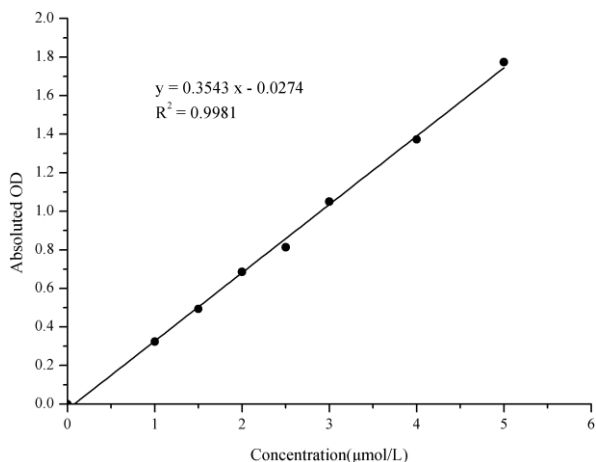
检测范围	0.02-5.0 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	5.5 %
灵敏度	0.02 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	2.1 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量50 μL ，按照操作步骤进行实验，各管OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	1	1.5	2	2.5	3	4	5
OD 值	0.081	0.394	0.578	0.768	0.891	1.125	1.404	1.822
	0.081	0.415	0.570	0.766	0.898	1.138	1.503	1.887
平均 OD 值	0.081	0.405	0.574	0.767	0.895	1.132	1.454	1.855
绝对 OD 值	0.000	0.324	0.493	0.686	0.814	1.051	1.373	1.774

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

例如检测Jurkat细胞(数据仅供参考):

取Jurkat细胞处理后的上清液50 μL ，加入到酶标板相应的测定孔中，按操作表检测，结果如下:

标准曲线: $y = 0.3807x - 0.0232$, 空白孔平均OD值为0.075, 测定NADP(H)总量时, 测定孔的平均OD值为0.654; 单独测定NADPH的含量时, 测定孔平均OD值为0.400, 测定蛋白浓度为0.063 gprot/L则计算结果为:

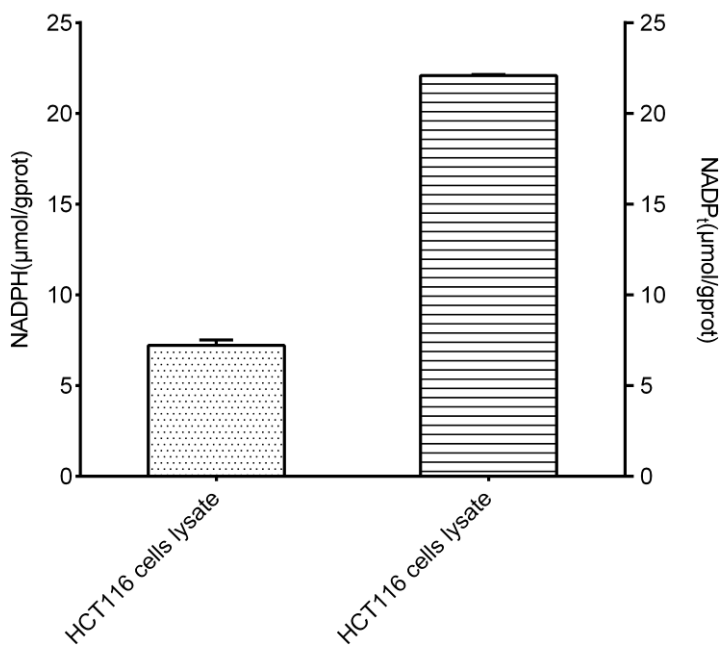
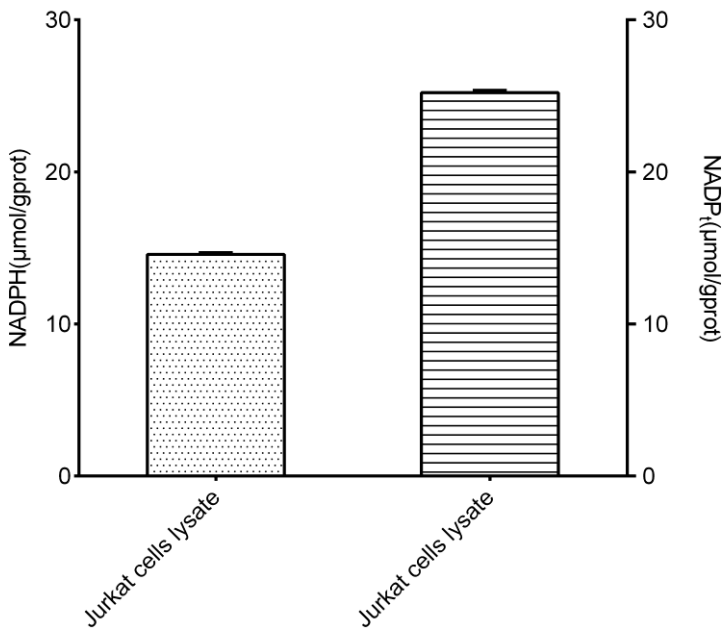
$$[\text{NADP}]_{\text{total}} (\mu\text{mol/gprot}) = (0.654 - 0.075 + 0.0232) \div 0.3807 \div 0.063 = 25.11 \mu\text{mol/gprot}$$

$$[\text{NADPH}] (\mu\text{mol/gprot}) = (0.400 - 0.075 + 0.0232) \div 0.3807 \div 0.063 = 14.52 \mu\text{mol/gprot}$$

$$[\text{NADP}^+] (\mu\text{mol/gprot}) = 25.11 - 14.52 = 10.59 \mu\text{mol/gprot}$$

$$[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}] = (25.11 - 14.52)/14.52 \times 100\% = 72.9\%$$

按照说明书, 测定Jurkat细胞匀浆液(蛋白浓度0.063 gprot/L, 加样量50 μL)和HCT116细胞匀浆液(蛋白浓度0.068 gprot/L, 加样量50 μL)中NADP(H)的总量及NADPH单独的量(如下图所示, 其中左边柱形图表示NADPH的量, 右边柱形图表示NADP(H)的总量):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定，复孔差异大	加样时间过长	尽可能的缩短加样时间
样本测不出值	反应时间过短	可适当延长反应时间
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675