改良型 NADP+/NADPH 检测试剂盒（WST-8 法）

（本试剂盒仅供科研使用）

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0704	改良型 NADP+/NADPH 检测试剂盒（WST-8 法）	100T

产品内容

名称	规格	储存条件
NADP+/NADPH 提取液	50mL	-20℃
NADPH	0.5mg	-20℃
G6PDH Enzyme（50×）	0.2mL	-20℃
显色液	1.1mL	-20℃
反应缓冲液	10mL	-20℃
1、NADPH 标准溶液的配置：使用 0.6mL 超纯水充分溶解 NADPH，配置成 1mM NADPH 标准溶液。 2、NADPH 标准曲线的设置：用 NADP+/NADPH 提取液将 1mM NADPH 标准溶液梯度稀释为 0μM、0.25μM、0.5μM、1μM、2μM、6μM 几种浓度，在 96 孔板每孔加入 10μL 标准液，即每孔标准品含量为 0pmoL、2.5pmoL、5pmoL、10pmoL、20pmoL、60pmoL。（注：标准品浓度 0μM 为空白对照，仅含 NADP+/NADPH 提取液） 3、G6PDH 工作液的配置：取适量 G6PDH 母液，用反应将其稀释 50 倍，制备成 G6PDH 工作液。（注：G6PDH 工作液需现用现配，每个标准品或样品需要 90μL G6PDH 工作液，根据所需用量配置）		

一、产品说明

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP）作为辅酶参与到很多氧化还原反应中，存在氧化型（NADP+）和还原型（NADPH）两种形式。

翼飞雪 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。

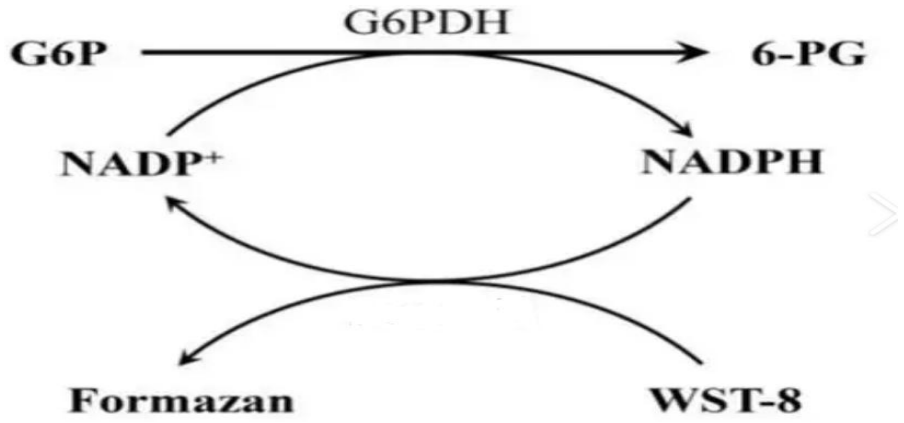
检测原理如下

1、检测氧化型辅酶（NADP+）和还原型辅酶（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-磷酸葡萄糖内脂(6·phosphogluconate,6-PG)，这一反应过程中氧化型辅酶(NADP+)被还原成还原型辅酶(NADPH)，生成的 NADPH 在电子载体存在下将 WST-8 还原成检黄色的甲臜(Formazam)，在 450 nm 处有最大吸收峰，体系中生成甲臜的量与 NADP+/NADPH 总量呈线性关系。

2、检测还原型辅酶（NADPH）含量：NADP+在给定的缓冲体系中不稳定，样本经过 60°C 加热 30 min 预处理后，体系中的氧化型辅酶(NADP+)分解，只保留还原型辅酶(NADPH)，还原型辅酶(NADPH)将 WST-8 还原成橙黄色的甲臜，通过比色法确定甲臜生成量来确定样品中还原型辅酶(NADPH)含量。

3、检测氧化型辅酶 (NADP+) 的含量：根据上述 NADP+/NADPH 总量及还原型辅酶(NADPH)的量，二者差值即为氧化型辅酶(NADP+)含量。据此计算出氧化型辅酶(NADP+)与还原型辅酶(NADPH)比值。

WST-8 法检测 NADP+/NADPH 总量原理图



二、试剂准备

1、NADPH 标准溶液的配置：取 0.5mg NADPH，用 600μL 超纯水配制成 1mM NADPH 标准溶液。 (**注:**由于 NADPH 稳定性较差，建议将 NADPH(1mM)溶液适当分装，于-80 ° C 避光保存。)

2、NADPH 标准曲线设置：用 NADP+/NADPH 提取缓冲液将 1mM NADPH 梯度稀释为 0-10μM，比如 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10μM 等几个浓度，对于 96 孔板每孔加入 10μL 标准品，即每孔标准品含量为 0pmoL、2.5pmoL、 5pmoL、 10pmoL、 20pmoL、 40pmoL、60pmoLl、80pmoL、100pmoL。(**注:** A. 标准品浓度为 0μM 为空白对照，仅含 NADP+/NADPH 提取液。 B. 根据实验需求配制不同浓度梯度的 NADPH 溶液，建议现配现用。)

3、G6PDH 工作液配制：每个标准品或样品需要 90μL G6PDH 工作液，根据实验样品取适量 G6PDH (G6PDH Enzyme) 用反应缓冲液将其稀释 50 倍制备工作液。(**注:** 请适量配制 G6PDH 工作液，并现配现用。)

三、样品制备

1、组织：用预冷的 PBS 清洗组织，取 10-30mg 组织样品，用剪刀剪碎置于匀浆器中，加入预冷的 400μL NADP+/NADPH 提取液，冰上匀浆。

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

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

4、裂解 10min 左右之后，4℃ 12000g 离心 10min，取上清待测。

四、含量测定

五、很难

1、样品中 NADP+/NADPH 总含量的检测：吸取 10μL 待测样品至 96 孔板中。（**注：**为减少实验误差建议设置 3-5 个复孔。）

样品中 NADP+、NADPH 含量或 NADP+/NADPH 比值的检测：吸取 50-100μL 待测样品至离心管中，60℃水浴或金属浴加热 30min，使 NADP+充分分解。

2、参考下表使用 96 孔板设置反应体系：

试剂名称（μL）	空白对照	标准品	样品
待测样品		10	10
NADP+/NADPH 提取液（μL）	10		
乙醇脱氢酶工作液	90	90	90

3、37℃避光孵育 10min，使样品中的 NADP+还原成 NADPH。

4、每孔加入 10μL 显色液并充分混匀，37℃避光孵育 10-20min。加入显色液后酶促循环反应即开始，橙黄色甲臜开始生成，检测 450 nm 处的吸光度。（**注：** A. 最终实验如发现样品中 NADP+和 NADPH 总量过高超出标准曲线范围，可用 NADP=/NADPH 提取缓冲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。 B. 在加入 G6PDH 酶工作液过程中必须轻柔操作，以免产生气泡，影响反应的均一性。 C. 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。）

5、含量的计算：

A. 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。。

B. 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。

C. 根据标准曲线计算 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；NADP+浓度为总浓度($NADP^+$+NADPH)减去 NADPH 浓度。(**注：** A. 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。 B. 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。）

六、注意事项

1、 使用前，将冻存的各组分充分融解并轻轻混匀后再使用。

2、 NADPH 配制成溶液后，建议分装后-80°C 保存。NADPH 不稳定，如果发现标准曲线不理想，有可能是标准品发生了降解，此时建议用新的 NADPH 粉末重新配置标准液。

3、 NADP+/NADPH 提取缓冲液比较粘稠，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。

4、 建议每次检测都重新绘制标准取曲线。

5、 NADP+和 NADPH 不稳定，样品在冻存过程中较易降解，建议使用新鲜样品进行检测。

6、 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。

7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。