NADP+/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法)说明书

NADP+/NADPH Assay Kit with WST-8 Product Manual

货号：JX28

产品介绍

NADP+/NADPH 检测试剂盒(WST-8 法) (NADP+/NADPH Assay Kit with WST-8)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+(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 以及 NAD+/NADH 的传统检测方法是检测 NADPH 或者 NADH 在 340nm 处吸收波长的变化，该方法灵敏度较低并易受样品中有类似紫外吸收物质的干扰，并且在紫外检测过程中通常需要加大检测样品量以弥补 NADPH 在 340nm 处吸光度过小的不足，因此该检测方法具有很大的局限性。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品。WST-8 产生的 formazan 都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤。并且 WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。再次，WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定，使实验结果更加稳定。另外，WST-8 和 MTT、XTT、WST-1 等相比，线性范围更宽，灵敏度更高。

本试剂盒使用便捷，无需分离纯化细胞、组织或其它样品中的 NADP+和 NADPH，且特异性检测 NADP+和 NADPH，而不检测 NAD+和 NADH。本试剂盒可以检测含量低至 0.05μM(2.5pmol)的 NADP+或 NADPH，在 0.05μM(2.5pmol)至 6μM (300pmol)之间呈现良好的线性关系。

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。NADP+也参与到生物合成反应中，比如脂质和核酸的合成。在动物细胞中，戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway，PPP)的氧化阶段是 NADPH 最主要的来源。

本试剂盒可检测样品中的 NADP+、NADPH 以及它们的比值，具体原理如下：

1）测定 NADP+/NADPH 的总量：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-磷酸葡萄糖酸内酯(6-phosphogluconate,6-PG)，在这一反应过程中 NADP+被还原为 NADPH；生成的 NADPH 在电子耦合试剂的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan，在 450nm 左右检测有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中总的 NADP+/NADPH 的总量呈比例关系。WST-8 法检测 NADP+和 NADPH 总量的原理参考图 1。

2）单独测定 NADPH 的量：60℃水浴加热 30 分钟后，样品中 NADP+会分解而只保留 NADPH。NADPH 将 WST-8 还原成 formazan，通过比色法确定反应生成的 formazan 的量，最终可以确定样品中 NADPH 的量。

3）测定 NADP+以及 NADP+/NADPH 比值：根据前两步检测获得的 NADP+和 NADPH 总量以及 NADPH 的量，即可得到样品中 NADP+的量以及 NADP+/NADPH 的比值。

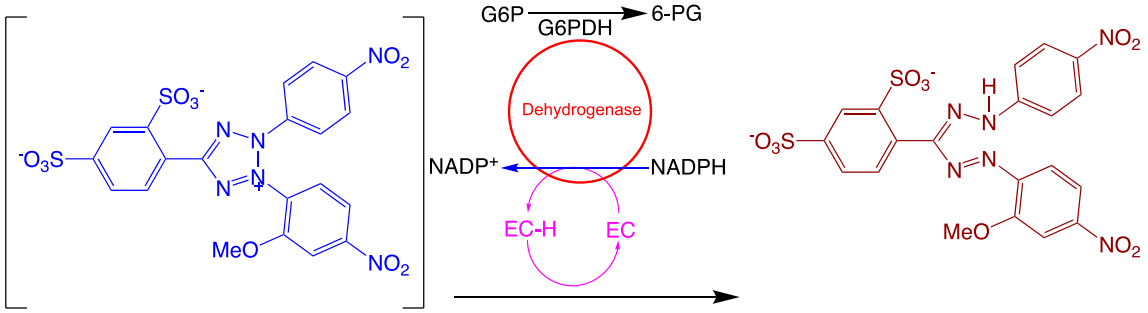

图 1. WST-8 法检测 NADP+和 NADPH 总量的原理图。

注意事项:

1)试剂盒中所有组份均要冷冻保存。如果不是一次用完，为避免反复冻融导致产品失效，请适当分装后保存。

2) NADPH 不稳定，取出 NADPH 后请尽快使用。如果发现标准曲线不理想，很有可能是标准品发生了降解。

3）由于 NADP+/NADPH 提取液本身比较粘稠，以该提取液作为稀释液时，无论对标准品还是样品进行稀释，在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。
4）在样品加样和混匀过程中，须尽量避免产生气泡，以免影响最终的吸光度测定。
5）如果不能非常严格地控制反应温度和反应时间，每次检测都需要设置标准曲线。
6）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。
7）由于 NADP+和 NADPH 很不稳定，在冻存过程中较易降解，所以宜尽量使用新鲜样品进行检测。
8）本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究，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。
9）本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！

试剂盒组份：

Cat No	Product Name	Size	
JX28	NADP+/NADPH Assay Kit with WST-8	100T	
Cat No	**Components**	**Quantity**	**Storage**
JX28-A	G6PDH	220uL	-20°C Protect from light 1 year
JX28-B	显色液	1.1mL	-20°C Protect from light 1 year
JX28-C	NADPH	5mg	-20°C Protect from light 1 year
JX28-D	NADP+/NADPH 提取液	50mL	-20°C Protect from light 1 year
JX28-E	反应缓冲液	11mL	-20°C Protect from light 1 year

保存条件：

密封避光-20℃保存，一年有效。显色液(JX28-B)和 NADPH(JX28-C)须-20℃避光保存。
NADPH 配制成溶液后，须适当分装后-80℃保存。所有试剂避免反复冻融。

使用方法：

1. 样品的准备：

1.1）**细胞样品的准备：**对于贴壁细胞，约 1×10^6 个细胞(大约相当于 6 孔板一个孔长满的细胞数量)，吸净培养液，用移液器加入 200uL 的 NADP+/NADPH 提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解；对于悬浮细胞，约 1×10^6 个细胞，600g 离心 5 分钟，吸净培养液，用移液器加入 200uL 冰浴预冷的 NADP+/NADPH 提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解；裂解过程在室温或冰上操作均可。随后 12,000g，4℃离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品备用。
1.2）**组织样品的准备：**冰上预冷的 PBS 洗涤组织后，称取约 10-30mg 的组织样品，用剪刀剪碎，置于匀浆器中，加入 400uL 的 NADP+/NADPH 提取液在室温或冰上进行匀浆。随后 12,000g，4℃离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品备用。

2. 试剂盒的准备工作：

2.1）**NADPH 标准品的配制：**吸取 6ml 超纯水充分溶解本试剂盒提供的 5mg NADPH 后即得到 1mM NADPH 标准品。1mM NADPH 标准品请适当分装后-80℃避光保存。
2.2）**NADPH 标准曲线的设置：**把 1mM 的 NADPH 标准品用 NADP+/NADPH 提取液稀释成适当的浓度梯度，如初次检测可以设置 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8μM 这几个浓度，检测时 96 孔板每孔加入 50uL 的标准品，相当于每孔为 0、12.5、25、50、100、200、300、400pmol 的 NADPH。如有必要，在后续的实验中可以根据样品中的 NADPH 含量对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为 0uM 的点为空白对照点，仅含 NADP+/NADPH 提取液。注意：由于 NADPH 很不稳定，故配制后需尽快使用。
2.3）**G6PDH 工作液的配制：**将 G6PDH 用反应缓冲液稀释 50 倍，例如 2uL G6PDH 加入到 98uL 的反应缓冲液中，即可获得 100uL 的 G6PDH 工作液。每个标准品或样品的检测需要使用 100uL 的 G6PDH 工作液，请根据所需检测的标准品和样品的数量，配制适量的 G6PDH 工作液，并注意现配现用。

3. 样品测定：

3.1） 样品中 NADP+和 NADPH 总量的测定：吸取 50uL 待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差请设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NADP+和 NADPH 的总量过高，超出标准曲线的范围，则需要用 NADP+/NADPH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；总量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。

3.2) 样品中 NADP+、NADPH 的含量或者 NADP+/NADPH 比值的测定：吸取 100-200uL 待测样品于离心管中，60℃水浴或 PCR 仪上加热 30 分钟以分解 NADP+。如果加热后产生不溶物，则需 10,000g，室温或 4℃离心 5 分钟，吸取 50uL 上清液作为待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NADP+或 NADPH 的含量过高，超出标准曲线的范围，则需要用 NADP+/NADPH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；含量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。

3.3) 请参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、标准品孔和样品孔。加入 G6PDH 工作液后充分混匀。

	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
待测样品	-	50uL	50uL
NADP+/NADPH 提取液	50uL	-	-
G6PDH 工作液	100uL	100uL	100uL

3.4) 37℃避光孵育 10 分钟。说明：此孵育步骤的目的是将样品中的 NADP+转化为 NADPH；在加入 G6PDH 工作液过程中须轻柔操作，以免产生气泡。若不慎出现气泡，可使用细小的吸头或针头戳破。

3.5) 适当混匀显色液，然后每孔加入 10uL 显色液，混匀，37℃避光孵育 10-20 分钟，此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm 处的吸光度。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。

4. 样品中 NADP+/NADPH 量的计算:

4.1) 计算标准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。

4.2) 以 NADPH 的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。NADPH 标准品的检测效果请参考图 2。如果孵育时间过长，高浓度标准品的显色会达到平台，此时宜选择未达到平台的标准品来绘制标准曲线，或者选择孵育时间较短的标准品吸光度数据来绘制标准曲线。

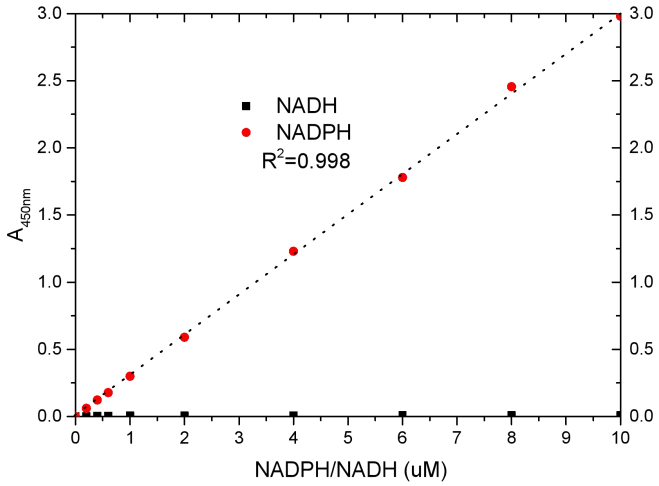

图 2. NADPH 的标准曲线。上图显示本试剂盒可以很好地检测出 NADPH 的含量，并且不会受 NADH 的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

4.3) 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的 NADP+和 NADPH 总浓度或者 NADPH 的浓度。未 60℃加热处理时，计算得到的是样品中 $NADP^+$和 NADPH 总量的浓度($NADP_{total}$)；60℃加热处理后，检测得到的是样品中 NADPH 的浓度。

备注：根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出 $NADP^+$、NADPH、$NADP_{total}$ 的量。

4.4) 根据如下计算公式，计算样品中 NADP+的量以及 NADP+/NADPH 的比值。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。

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

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

4.5) 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。