



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

NADP⁺/NADPH检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0179	NADP ⁺ /NADPH检测试剂盒(WST-8法)	100次

产品简介:

- 碧云天的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，和MTT或其它MTT类似产品如XTT、MTS等相比有明显的优点。首先，MTT被一些脱氢酶还原生成的formazan不是水溶性的，需要有特定的溶液来溶解；而WST-8和XTT、MTS产生的formazan都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤。其次，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等相比，线性范围更宽，灵敏度更高。
- WST-8和WST-1相比，检测灵敏度更高，更易溶解，并且更加稳定。
- 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：
 - 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1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate)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。
 - 单独测定NADPH的量：60°C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。
 - 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。

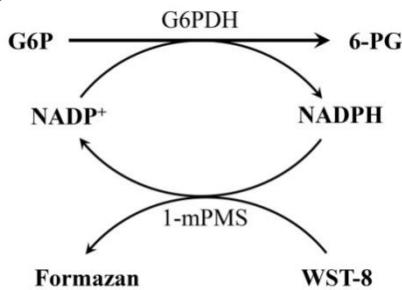


图1. WST-8法检测NADP⁺和NADPH总量的原理图。

- 本试剂盒适用于检测细胞、组织以及其他适当样品中的NADP⁺和NADPH各自的量、比值和总量。
- 当仅检测NADP⁺和NADPH的总量或者样品中的NADPH的量时，一个本试剂盒可以进行100次检测；当检测NADP⁺或者NADP⁺/NADPH的比值时，一个本试剂盒可以进行50次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0179-1	G6PDH	220μl
S0179-2	显色液	1.1ml

S0179-3	NADPH	5mg
S0179-4	NADP ⁺ /NADPH提取液	50ml
S0179-5	反应缓冲液	11ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。显色液(S0179-2)和NADPH (S0179-3)须-20°C避光保存。NADPH配制成溶液后，须适当分装后-80°C保存。所有试剂避免反复冻融。

注意事项：

- 本试剂盒中的所有试剂均需要冷冻保存，请严格按照保存条件进行保存。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。
- NADPH不太稳定，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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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. 样品的准备：

- 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200μl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200μl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°C离心5-10分钟，取上清作为待测样品备用。
- 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400μl的NADP⁺/NADPH提取液在室温或冰上进行匀浆。随后12,000g，4°C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：

- 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°C避光保存。
- 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50μl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0μM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。
- G6PDH工作液的配制：将G6PDH用反应缓冲液稀释50倍，例如2μl G6PDH加入到98μl的反应缓冲液中，即可获得100μl的G6PDH工作液。每个标准品或样品的检测需要使用100μl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：

- 样品中NADP⁺和NADPH总量的测定：吸取50μl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。
- 样品中NADP⁺、NADPH的含量或者NADP⁺/NADPH比值的测定：吸取100-200μl待测样品于离心管中，60°C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°C离心5分钟，吸取50μl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。
- 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	—	50μl	50μl
NADP ⁺ /NADPH提取液	50μl	—	—
G6PDH工作液	100μl	100μl	100μl

- d. 37°C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。
- e. 适当混匀显色液，然后每孔加入10μl显色液，混匀，37°C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：

- a. 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。
- b. 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。

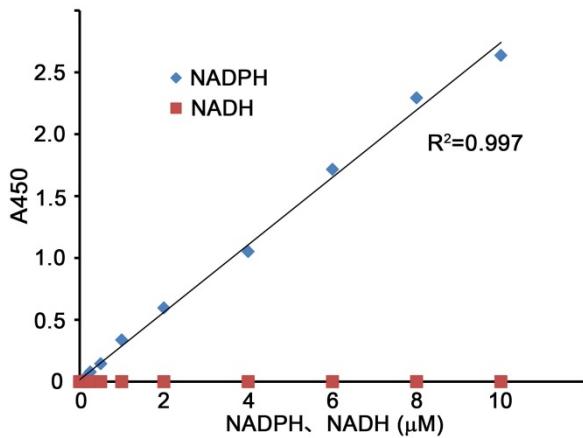


图2. NADPH的标准曲线。上图显示本试剂盒可以很好地检测出NADPH的含量，并且不会受NADH的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- c. 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°C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°C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。

- d. 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。

$$[\text{NADP}^+] = [\text{NADP}_{\text{total}}] - [\text{NADPH}]$$

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

- e. 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。

使用本产品的文献：

- Ma Y,Qi Y,Wang L,Zheng Z,Zhang Y,Zheng J. SIRT5-mediated SDHA desuccinylation promotes clear cell renal cell carcinoma tumorigenesis. FREE RADICAL BIO MED. 2019 Apr;134:458-467.
- Xie GH,Dai HJ,Liu F,Zhang YP,Zhu L,Nie JJ,Wu JH. A Dual Role of ATM in Ischemic Preconditioning and Ischemic Injury. Cell Mol Neurobiol. 2019 Dec 16;
- Jialei Sun,Chenhao Zhou,Yue Zhao,Xiaofei Zhang,Wanyong Chen,Qiang Zhou,Bo Hu,Dongmei Gao,Lisa Raatz,Zhefang Wang,Peter J Nelson,Yuchao Jiang,Ning Ren,Christiane J Bruns,Haijun Zhou. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by driving EGFR endosomal trafficking and inhibiting NRF2 activation. Redox Biol. 2021 May;41:101942.
- Fenglan Qin,Huige Zhou,Jiayang Li,Jing Liu,Yaling Wang,Ru Bai,Shihui Liu,Manman Ma,Tao Liu,Fene Gao,Peiyao Du,Xiaoquan Lu,Chunying Chen. Hypoxia and pH co-triggered oxidative stress amplifier for tumor therapy. Eur J Pharmacol. 2021 Aug 15;905:174187.
- Yi Wen,Hansen Chen,Lu Zhang,Meiling Wu,Feng Zhang,Dan Yang,Jiangang Shen,Jianping Chen. Glycyrrhetic acid induces oxidative/nitrative stress and drives ferroptosis through activating NADPH oxidases and iNOS, and depriving glutathione in triple-negative breast cancer cells. Free Radic Biol Med. 2021 Sep;173:41-51.
- Mingming Sun,Hao Sheng,Tingfeng Wu,Jiaqi Song,Huanran Sun,Yingzhi Wang,Jiyan Wang,Zhen Li,Huifang Zhao,Junzhen Tan,Yanping Li,Guo Chen,Qingrong Huang,Yuan Zhang,Bei Lan,Shuangping Liu,Changliang Shan,Shuai Zhang. PIKE-A promotes glioblastoma growth by driving PPP flux through increasing G6PD expression mediated by phosphorylation of STAT3. Biochem Pharmacol. 2021 Oct;192:114736.
- Yan Wang,Haojie Jin,Yafang Wang,Yang Yao,Cuixia Yang,Jihong Meng,Xiaomu Tan,Yu Nie,Lixiang Xue,Baohui Xu,Heng Zhao,Feng Wang. Sult2b1 deficiency exacerbates ischemic stroke by promoting pro-inflammatory macrophage polarization in mice. Theranostics. 2021 Nov 1;11(20):10074-10090.
- Jian Luo,Qiang He,Jin-Zhi Xu,Chen Xu,Yin-Ze Han,Hai-Long Gao,Xian-Zhi Meng,Guo-Qing Pan,Tian Li,Ze-Yang Zhou. Microsporidia infection upregulates host energy metabolism but maintains ATP homeostasis. J Invertebr Pathol. 2021 Nov;186:107596.
- Ting Liu,Qianqian Ma,Wenjie Li,Yan Hu,Jun Yang,Qi Yao. Ubiquilin 1 suppresses the cancer stem cell-like traits of non-small cell lung cancer cells by regulating reactive oxygen species homeostasis. Bioengineered. 2021 Dec;12(1):7143-7155.