

概述

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)是磷酸戊糖途径(一种细胞代谢途径)反应中一种重要的辅因子。NADP以氧化态NADP⁺和还原态NADPH的形式存在于细胞中。NADPH不光对脂肪酸、胆固醇而且对还原型谷胱甘肽的生成至关重要。另外最近的研究表明，NADP⁺/NADPH通过限制碳水化合物的摄入来延长寿命与NADP⁺/NADPH有很大关联¹⁾。

NADP/NADPH Assay Kit-WST能定量检测细胞中总NADP⁺/NADPH、NADPH和NADP⁺的量，并计算它们的比值。细胞内NADPH水平可以用试剂盒内的Extraction Buffer裂解细胞后加热进行定量检测。而细胞内的NADP⁺水平则可以通过总NADP⁺/NADPH减去NADPH的量计算得到。

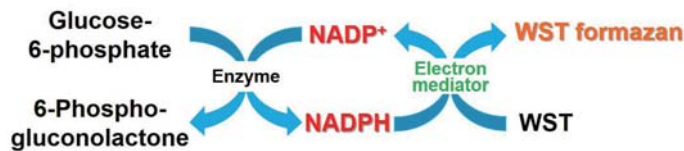


图1. 用NADP/NADPH Assay Kit-WST检测NADP的原理

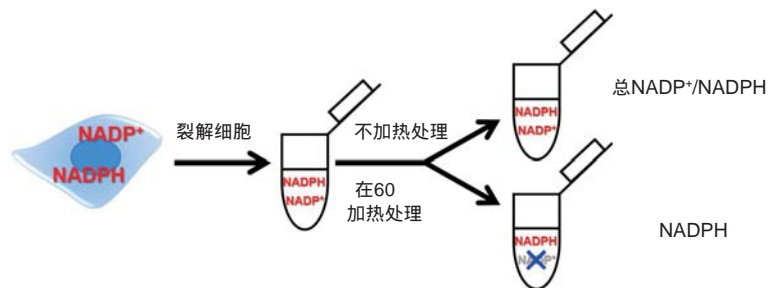


图2. 总NADP⁺/NADPH、NADPH和NADP⁺的检测方法

试剂盒内含

NADP/NADPH Extraction Buffer	20 ml x 1
NADP/NADPH Control Buffer	20 ml x 1
Standard Buffer	10 ml x 1
Assay Buffer	5.5 ml x 1
Dye Mixture (红盖)	x 1
Enzyme (绿盖)	110 μl x 1
Standard (蓝盖)	x 1
超滤管	x 12

储存条件

在0-5 保存

所需的设备和材料

- 酶标仪 (450 nm滤光片)
- 96孔板
- 培养箱 (37 , 60)
- 20-200 μl多通道移液器
- 移液器 (100-1,000 μl , 20-200 μl , 2-20 μl)

注意事项

- 使用前将试剂盒恢复至室温后使用。
- 因为内容物可能粘附在管壁或管盖上，在开盖前请离心管子 (Dye Mixture和Standard)。
- 由于酶会悬浮在液体上层，在使用前请先吹打混匀以获得均质的液体。
- 推荐每个样品做3个复孔以获得准确的数据。
- 由于在Working Solution加入孔中后酶会立刻反应，请使用多通道移液器以减少由于加样时间延迟而导致的实验误差。
- 请准备不同稀释比例的样品，并确定一个合适的稀释比例以使浓度范围在0-1 μmol/l。

配制Dye Mixture储存液

在Dye Mixture管中加入550 μl超纯水并充分溶解。

因为内容物可能粘附在管壁或管盖上，在开盖前请先离心管子。

Dye Mixture储存液在-20 避光可以保存2个月。

配制Standard储存液 (10 mmol/l)

在Standard管中加入20 μl 超纯水，并吹打溶解。

因为内容物可能粘附在管壁或管盖上，在开盖前请先离心管子。

Standard储存液要在冰浴中实验。

Standard储存液在-20 可以保存2个月。

配制Working Solution

(1) 将Dye Mixture储存液加入圆锥管中，并用Assay Buffer稀释。

(2) 将Enzyme加入到步骤 (1) 配制的溶液中。

	48孔板	96孔板
Dye Mixture 储存液	270 μl	540 μl
Assay Buffer	2.43 ml	4.86 ml
Enzyme	54 μl	108 μl

表1.Working Solution配制例

Working Solution对光敏感，请在使用前配制，并用铝箔包裹避光，请在当天内用完。

1. 样品制备

(1) 在1.5 ml微量管中制备细胞悬液 (5-40 × 10⁵ 个细胞)。

(2) 在300 × g离心5 min，去除上清液。

(3) 在每管中加入500 μl PBS，吹打悬液，在300 × g离心5 min，去除上清液。

(4) 在每管中加入300 μl NADP/NADPH Extraction Buffer，吹打裂解细胞，在12,000 × g离心5 min。

(5) 将250 μl上清液转移到MWCO 10K超滤管中，并在12,000 × g离心10 min。

测定总NADP⁺/NADPH和NADPH各至少需要100 μl样品 (总样品量：200 μl)。

(6) 参照图3分别在2个1.5 ml微量管中加入100 μl滤液，并将其分别作为总NADP⁺/NADPH和NADPH的样品。

(7) 将NADPH的样品溶液在60 培养60 min。

此步是为了分解样品溶液中的NADP⁺。

在检测前，将用于检测总NADP⁺/NADPH的样品溶液放在冰浴中。

(8) 培养后，将步骤7中的样品溶液冷却至室温。

(9) 分别在步骤6的总NADP⁺/NADPH样品管中和步骤8的NADPH的样品管中加入100 μl NADP/NADPH Control Buffer，用这些溶液进行检测。

检测时每孔需要50 μl样品。

请准备不同稀释比例的样品，并确定一个合适的稀释比例以使浓度范围在0-1 μmol/l。用NADP/NADPH Control Buffer稀释样品。

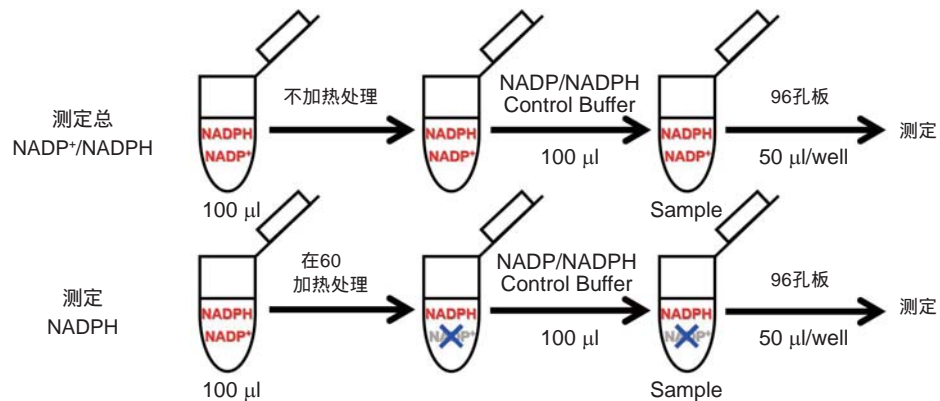


图3. 分别检测总NADP⁺/NADPH和NADPH的示意图

2. 配制标准液

- (1) 用198 μl 超纯水稀释2 μl 10 mmol/l的Standard储存液，配制成100 $\mu\text{mol/l}$ 的标准液。
- (2) 将5 μl 100 $\mu\text{mol/l}$ 标准液和495 μl Standard Buffer在离心管中混合，配制成1 $\mu\text{mol/l}$ 的标准液。
用Standard Buffer如下图稀释配制系列浓度 (浓度分别为1 $\mu\text{mol/l}$, 0.5 $\mu\text{mol/l}$, 0.25 $\mu\text{mol/l}$, 0.125 $\mu\text{mol/l}$, 0.0625 $\mu\text{mol/l}$, 0.0313 $\mu\text{mol/l}$, 0.0157 $\mu\text{mol/l}$ 和0 $\mu\text{mol/l}$) 的标准液。

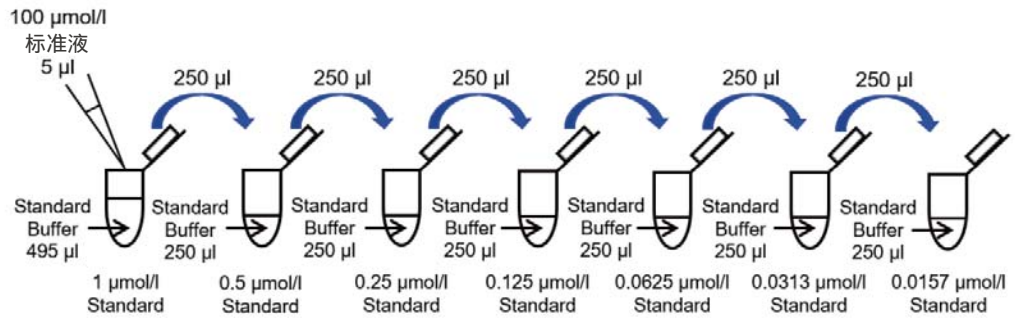


图4. 配制标准液

3. 检测

- (1) 按照图5，在每孔中分别加入50 μl 的标准液和样品溶液。

为了获得准确的数据，建议每个样品做3个复孔。

	1	2	3	4	5	6
A	0 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 1 (总NADP ⁺ /NADPH)		
B	0.0157 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 1 (NADPH)		
C	0.0313 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 2 (总NADP ⁺ /NADPH)		
D	0.0625 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 2 (NADPH)		
E	0.125 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 3 (总NADP ⁺ /NADPH)		
F	0.25 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 3 (NADPH)		
G	0.5 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 4 (总NADP ⁺ /NADPH)		
H	1 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 4 (NADPH)		

图5. 96孔板排列示例 (n=3)

- (2) 在每孔中加入50 μl Working Solution。

由于在加入Working Solution后酶会立刻反应，请用多通道移液器以减少由于加液时间延迟而导致的实验误差。

- (3) 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养60 min。

培养时请密封培养板，以防止液体蒸发。

- (4) 用酶标仪在450 nm处检测吸光度。

- (5) 用标准曲线测定样品中总NADP⁺/NADPH和NADPH的量。

如果原样品在检测前已稀释，可用稀释倍率乘以检测的数值。

NADP⁺的量可用下列计算公式计算：总NADP⁺/NADPH - NADPH的量计算得到。

$$\text{NADP}^+ = \text{总NADP}^+/\text{NADPH} - \text{NADPH}$$

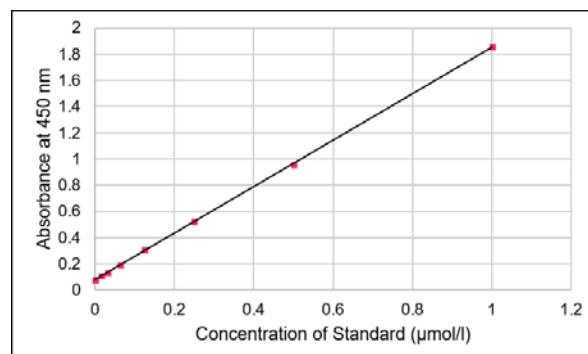


图6. 标准曲线

实验例

检测Jurkat细胞中总NADP⁺/NADPH, NADP⁺, NADPH的量以及NADP⁺/NADPH比值。

- (1) 在1.5 ml微量管中制备Jurkat细胞悬液 (1.0 × 10⁶个细胞/管和2.0 × 10⁶个细胞/管)。
- (2) 在300 × g离心5 min后去除上清液。
- (3) 在每管中加入500 μl PBS，在300 × g离心5 min后去除上清液。
- (4) 在每管中加入300 μl NADP/NADPH Extraction Buffer，吹打裂解细胞后，在12,000 × g离心5 min。
- (5) 取250 μl上清液加入到MWCO 10K超滤管中，在12,000 × g离心10 min。
- (6) 分别在2个1.5 ml微量管中加入100 μl滤液，将其分别作为总NADP⁺/NADPH和NADPH的样品。在检测前，总NADP⁺/NADPH的样品需在冰浴中保存。
- (7) 将NADPH的样品溶液在60 °C培养60 min，培养后将样品溶液冷却至室温。
- (8) 分别在总NADP⁺/NADPH样品管中和NADPH的样品管中加入100 μl NADP/NADPH Control Buffer，用这些溶液进行检测。
- (9) 按照标准液的配制方法配制系列标准液。
- (10) 在每孔中分别加入50 μl样品和50 μl 标准液。
- (11) 在每孔中加入50 μl Working Solution。
- (12) 在37 °C培养箱中培养60 min。
- (13) 用酶标仪在450 nm处检测吸光度，根据标准曲线计算样品中总NADP⁺/NADPH和NADPH的量。
NADP⁺的量=总NADP⁺/NADPH的量 - NADPH的量

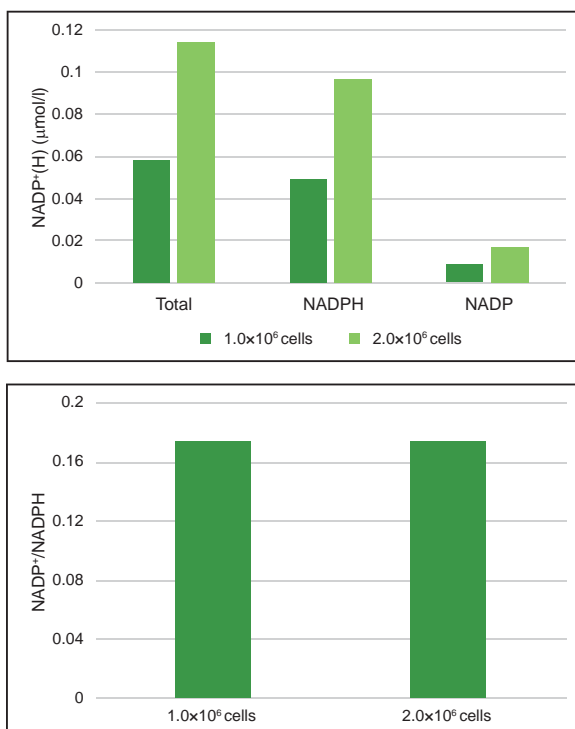


图7. Jurkat细胞中总NADP⁺/NADPH的量，NADP⁺的量，NADPH的量以及NADP⁺/NADPH的比值。

参考文献

Richard L. Veech, *et al.*, Ketone Bodies Mimic the Life Span Extending Properties of Caloric Restriction, *IUBMB Life*, **2017**, *69*, 305-314

DOJINDO 东仁化学科技(上海)有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编：200030

邮编：100029

电话：400-823-9388

电话：010-8225-1765

2018年9月