

# NADP/NADPH Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence)

## NADP/NADPH 比率荧光检测试剂盒（红色荧光）

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
NADP/NADPH Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence)	50140ES72	250 T
NADP/NADPH 比率荧光检测试剂盒（红色荧光）		

### 产品描述

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD，辅酶I）和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP，氧化型辅酶II）是细胞中常见的重要辅因子，通过电子交换参与各种代谢反应。NAD 与一个磷酸分子以酯键结合形成 NADP，NADP 作为氧化剂参与光合作用。还原性辅酶 II (NADPH) 是 NADP 接受电子后的产物。NADPH 作为供氢体可参与体内多种代谢反应，如：脂肪酸和核酸的合成。

该试剂盒适用于测定 NADP 和 NADPH，背景低，灵敏度高。NADPH 可以将探针还原为高荧光产物，其信号可以通过荧光酶标仪在 Ex/Em = 540/590 nm 或在比色测定(OD =576 nm)中定量。

### 产品组分

组分编号	组分名称	组分规格	储存条件
50140-A	NADP/NADPH Recycling Enzyme Mix	2 vials	-20°C
50140-B	NADPH Sensor Buffer	20 mL×1	-20°C
50140-C	NADPH Standard	1 vial (167 µg)	-20°C
50140-D	NADPH Extraction Solution	10 mL×1	-20°C
50140-E	NADP Extraction Solution	10 mL×1	-20°C
50140-F	NADP/NADPH Control Solution	10 mL×1	-20°C
50140-G	NADP/NADPH Lysis Buffer	10 mL×1	-20°C

### 运输和保存方法

冰袋运输。避光保存于-20°C，有效期 1 年。

### 注意事项

- 1 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 2 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3 粉末溶解前请先短暂离心，以保证产品全在管底。
- 4 请勿吸入、吞咽或者直接接触皮肤和眼睛。
- 5 本产品仅用于科研用途。

### 实验过程

#### 1 试剂准备

① **NADPH 标准品母液(1 mM)**: 将 200  $\mu\text{L}$  PBS (pH 7.4)加入 NADPH Standard (C 组分) 中制备 1 mM NADPH 标准品母液, 用时置于冰上, 未用完的分装-20 $^{\circ}\text{C}$  保存, 避免反复冻融。

② **NADPH 梯度标准液(0-10  $\mu\text{M}$ )**: 将 990  $\mu\text{L}$  PBS (pH 7.4)加入到 10  $\mu\text{L}$  NADH 标准母液(1 mM)中制备 10  $\mu\text{M}$  NADPH 标准液, 然后取 200  $\mu\text{L}$  的 10  $\mu\text{M}$  NADPH 标准液按照 1:3 的比例用 PBS (pH 7.4)稀释成 NADPH 梯度标准液(3.33  $\mu\text{M}$ , 1.11  $\mu\text{M}$ , 0.37  $\mu\text{M}$ , 0.123  $\mu\text{M}$ , 0.041  $\mu\text{M}$ , 0.014  $\mu\text{M}$ )。

【注】: 稀释后的 NADPH 标准液不稳定, 应该配置后 4 h 内使用。

③ **NADP/NADPH 反应液**: 向每瓶 NADP/NADPH Recycling Enzyme Mix (组分 A) 中加入 10 mL NADPH Sensor Buffer (B 组分), 混匀。

【注】: 相当于 125 次测试的检测用量, 请根据实际情况进行调整。NADP/NADPH 反应液在室温下不稳定, 注意避光尽快使用。

④ **NADP/NADPH Lysis Buffer (组分 G)**: 用前恢复至室温。

## 2 样本制备

2.1 细胞样本: 收集  $0.5-1 \times 10^7$  个细胞, 预冷 PBS 润洗后, 加入 100  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH Lysis Buffer (组分 G), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 1500 rpm 室温离心 5 min, 取上清检测。

2.2 组织样本: 取 20 mg 组织样本, 预冷 PBS 润洗后, 加入 400  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH Lysis Buffer (组分 G), 室温匀浆, 2500 rpm 室温离心 5-10 min, 取上清检测。

2.3 细菌样本: 4 $^{\circ}\text{C}$  10,000 g 离心 15 min 收集细菌, 每  $10^7$  个细菌加入 1 mL NADP/NADPH Lysis Buffer (组分 G), 室温孵育 15 min, 2500 rpm 室温离心 5-10 min, 取上清检测。

2.4 植物样本: 取 200 mg 叶片, 加入 1 mL NADP/NADPH Lysis Buffer (组分 G), 室温匀浆, 2500 rpm 室温离心 5-10 min, 取上清检测。

【注】: 建议使用新鲜样本, 如果无法及时进行检测, 样本建议存于-80 $^{\circ}\text{C}$ , 检测时冰上解冻, 但是检测的荧光值可能会降低。不要使用 RIPA 裂解液, 因为 RIPA 裂解液会干扰检测。如果样本中 NADPH 含量高, 注意稀释样本。

## 3 检测过程

3.1 如下图, 向 96 孔黑色平底孔板中加入 25  $\mu\text{L}$  的 NADPH 标准液、待测样本或空白对照(PBS)。

Table 1. Layout of NADPH standards, Blank Control and test samples in a solid black 96-well microplate.

BL	BL	TS (Total)	TS (Total)	TS (NADPH)	TS (NADPH)	TS (NADP)	TS (NADP)
NS1	NS1	...	...			...	...
NS2	NS2	...	...			...	...
NS3	NS3						
NS4	NS4						
NS5	NS5						
NS6	NS6						
NS7	NS7						

NS= NADPH Standard, BL = Blank Control, TS (Total) = Test Sample treated with NADP/NADPH Control Solution, TS (NADPH) = test sample treated with NADPH Extraction Solution, then neutralized by NADP Extraction, TS (NADP) = test sample treated with NADP Extraction Solution, then neutralized by NADPH Extraction Solution

3.2 对于 NADPH 提取: 向待测样本中加入 25  $\mu\text{L}$  NADPH Extraction Solution (组分 D), 室温孵育 10-15 min, 再加入 25  $\mu\text{L}$  NADP Extraction Solution (组分 E) 中和。

3.3 对于 NADP 提取: 向待测样本中加入 25  $\mu\text{L}$  NADP Extraction Solution (组分 E), 室温孵育 10-15 min, 再加入 25  $\mu\text{L}$  NADPH Extraction Solution (组分 D) 中和。

3.4 对于总 NADP 和 NADPH: 向待测样本中加入 25  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH Control Solution (组分 F), 室温孵育 10-15 min, 再加入 25  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH Control Solution (组分 F)。

3.5 对于 NADH 标准液 NS1-7: 向 NADPH 标准液中加入 25  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH Control Solution (组分 F), 室温孵育 10-15 min, 再加入 25  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH Control Solution (组分 F)。

Table 2 Reagent composition for each well

Well	Reagent	Treatment	Incubate at RT 10-15 min	Treatment	Total Volume
NS1-7	25 $\mu\text{L}$ NADPH Standard (0-10 $\mu\text{M}$ NADPH)	25 $\mu\text{L}$ F		25 $\mu\text{L}$ F	75 $\mu\text{L}$
BL	25 $\mu\text{L}$ PBS (pH 7.4)	25 $\mu\text{L}$ F	25 $\mu\text{L}$ F	75 $\mu\text{L}$	
TS (Total)	25 $\mu\text{L}$ Test sanmple	25 $\mu\text{L}$ F	25 $\mu\text{L}$ F	75 $\mu\text{L}$	
TS (NADPH)	25 $\mu\text{L}$ Test sanmple	25 $\mu\text{L}$ D	25 $\mu\text{L}$ E	75 $\mu\text{L}$	
TS (NADP)	25 $\mu\text{L}$ Test sanmple	25 $\mu\text{L}$ E	25 $\mu\text{L}$ D	75 $\mu\text{L}$	

3.6 每孔中加入 75  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH 反应液 (测试总体积 150  $\mu\text{L}$ ), 混匀后, 室温避光孵育 15 min-2 h。

3.7 荧光酶标仪下测量荧光读数(Ex/Em = 540/590 nm); 也可以使用白色透明 96 孔板, 使用酶标仪在 OD=576 $\pm$ 5nm 的波长下读数, 但灵敏度低于荧光检测。

【注】: 高浓度的 NADPH (终浓度>100  $\mu\text{M}$ ) 会导致荧光读数下降, 因为 NADPH sensor 被过度氧化, 生成非荧光产物。

## 数据分析

1 从空白标准孔获得的读数用作阴性对照。从其他标准的读数中减去该值, 以获得基线校正值, 荧光背景会随时间而增加, 因此标准和测试样本的荧光读数计算前需减去空白孔的荧光强度值。然后, 通过绘制标准读数以获得标准曲线和方程。

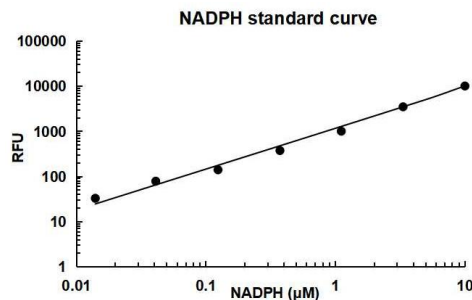


图 1 NADPH 标准曲线

加入 75  $\mu\text{L}$  NADP/NADPH 反应液后室温避光孵育 30 min 后, 荧光酶标仪下测量荧光读数。

2 样本中 NADPH 含量计算公式:  $\text{NADPH concentration} = (B/V) \times D$ 。B 代表根据标曲计算出的测试样本中 NADPH 的含量 ( $\mu\text{M}$ ), V 代表测试样本体积( $\mu\text{L}$ ), D 代表测试样本稀释倍数。

3 样本中总 NADP 和 NADPH 含量计算公式:  $\text{Total concentration} = (B/V) \times D$ 。B 代表根据标曲计算出的测试样本中总的 NADP 和 NADPH 的含量( $\mu\text{M}$ ), V 代表测试样本体积( $\mu\text{L}$ ), D 代表测试样本稀释倍数。

4 使用总 NADP 和 NADPH 含量减去 NADPH 来计算 NADP 的量。

