

はじめに

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP) は主に、細胞内代謝経路の1つであるペントース・リン酸経路での反応に関与する補酵素です。NADP は細胞内において、酸化型の NADP<sup>+</sup> と還元型の NADPH として存在しています。NADPH は、脂肪酸やコレステロールの生合成や、還元型グルタチオンの生成に関与しています。また、最近の研究で、糖質制限による寿命延長に、NADP<sup>+</sup>/NADPH が関連しているということが報告されています<sup>1)</sup>。

NADP/NADPH Assay Kit-WST は、細胞内の総 NADP<sup>+</sup>/NADPH、NADPH および NADP<sup>+</sup> の定量、さらに NADP<sup>+</sup> と NADPH の比率を測定することができるキットです。本キットに含まれる抽出バッファーを用いて調製した細胞ライセートを加熱処理することにより、細胞内 NADPH のみを定量することができ、別途測定した総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量から NADPH 量を差し引くことで、細胞内 NADP<sup>+</sup> 量を求めることができます。

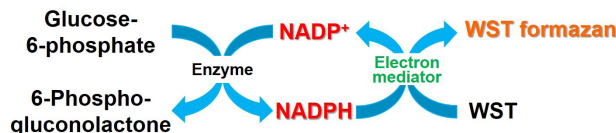


図 1 NADP/NADPH Assay Kit-WST による測定原理

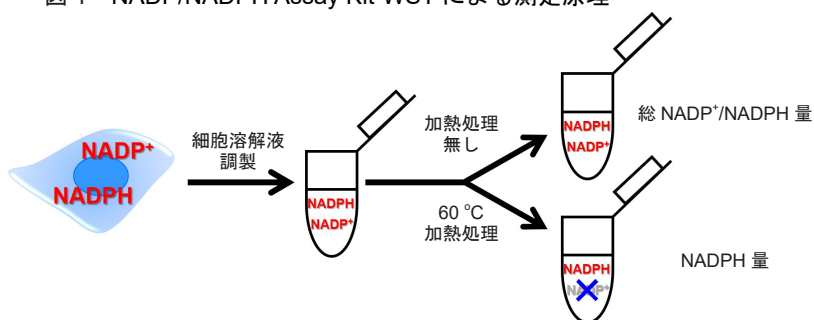


図 2 NADP/NADPH Assay Kit-WST を用いた総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量、NADPH 量および NADP<sup>+</sup> 量の検出方法

キット内容

NADP/NADPH Extraction Buffer	20 mL × 1
NADP/NADPH Control Buffer	20 mL × 1
Standard Buffer	10 mL × 1
Assay Buffer	5.5 mL × 1
Dye Mixture (赤キャップ)	× 1
Enzyme (緑キャップ)	110 μL × 1
Standard (青キャップ)	× 1
Filtration Tube	× 12

※本キットでは、n=3 の測定で標準サンプル 8 点と測定用サンプル 12 サンプル分の測定が可能です。そのため、Filtration Tube は 12 サンプル分を同梱しております。12 サンプル以上の測定試料を調製する際は、別途 Filtration Tube (ナノセップ遠心ろ過デバイス (10K)([OD010C33], PALL 社)) をご準備頂く必要があります。

保存条件

0-5 °C で保存して下さい。

必要なもの  
(キット以外)

- プレートリーダー (450 nm の吸光フィルター)
- 96 穴マイクロプレート
- インキュベーター (37 °C、60 °C)
- 20-200 μL のマルチチャンネルピペット
- 100-1000 μL、20-200 μL、2-20 μL マイクロピペット

使用上のご注意

- ・キットの中の試薬は、室温に戻してからご使用下さい。
- ・輸送中の振動等により、内容物がアシストチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、開封前に振り落としてからご使用下さい。
- ・Enzyme は酵素懸濁液です。静置しておくと酵素が沈殿しますので、ピペッティングにより均一な懸濁液にしてご使用下さい。
- ・正確な測定値を得るために、1 つの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルをご使用下さい。
- ・Working solution をサンプルに加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグによる測定誤差を少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用ください。
- ・測定試料は、検量線範囲内に入るように希釈したものを数種類調製し、測定に用いて下さい。

溶液調製

### Dye Mixture stock solution の調製

Dye Mixture に超純水 550 μL を加え、転倒混和により溶解する。

※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。

※ Dye Mixture stock solution は、遮光下、-20 °C 以下で保存して下さい (2 ヶ月間安定)。

### Standard stock solution (10 mmol/L) の調製

Standard に超純水 20 μL を加え、ピペッティングにより溶解する。

※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。

※ Standard stock solution は氷浴上で使用し、溶解後は -20 °C 以下で保存して下さい (2 ヶ月間安定)。

### Working solution の調製

(1) コニカルチューブに Dye Mixture stock solution を加え、

Assay Buffer で希釈する。

(2) 操作 (1) で調製した溶液に Enzyme を加える。

※ Working solution 調製における各溶液使用量は、表 1 を参照して下さい。

※ Working solution は光に不安定であるため、使用前に調製し、調製後はアルミホイルで覆うなどして遮光して下さい。また、調製後の Working solution は保存できません。その日のうちにお使い下さい。

	48ウェル分	96ウェル分
Dye Mixture stock solution	270 μL	540 μL
Assay Buffer	2.43 mL	4.86 mL
Enzyme	54 μL	108 μL

表 1 Working solution 調製例

### 1. 測定用サンプルの調製

- (1) 細胞 (5–40×10<sup>5</sup> cells) を 1.5 mL マイクロチューブに準備する。
  - (2) 300×g で 5 分間遠心し、上清を除去する。
  - (3) PBS 500 μL を加え、ピペティングにより懸濁後、300×g で 5 分間遠心し、上清を除去する。
  - (4) NADP/NADPH Extraction Buffer 300 μL を加え、ピペティングにより細胞を溶解した後、12,000×g で 5 分間遠心する。  
 ※ピペティング後、溶液の粘性が高いと遠心後の分離が困難になる場合があります。その際は、シリンジに 25G 程度の細い針を付け、サンプル溶液をシリンジでスムーズに出し入れができるまで (20–30 回) 混合してお使い下さい。
  - (5) 上清 250 μL を MWCO 10K フィルトレーションチューブに移し、12,000×g で 10 分間遠心する。  
 ※測定用サンプルは、総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量の両方を測定する場合、合計 200 μL 以上は必要です。  
 ※遠心後の濾液が 200 μL 以上ない場合は、遠心時間を延長して下さい。
  - (6) 得られた濾液を、1.5 mL マイクロチューブ 2 本に 100 μL ずつ移し、総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量測定試料とする (図 3 参照)。
  - (7) NADPH 量測定試料を 60 °C で 60 分間インキュベートする。  
 ※本操作により、NADPH 量測定試料中に含まれる NADP<sup>+</sup> を分解します。  
 ※総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量測定試料は測定までの間、氷浴中で保存して下さい。
  - (8) インキュベート後、測定試料を室温まで冷却する。
  - (9) 操作 (6) および操作 (8) で調製した、総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量測定試料が入ったチューブそれぞれに、NADP/NADPH Control Buffer 100 μL を加えたものを測定に用いる (Sample)。
- ※測定試料は 1 ウェルあたり 50 μL 必要です。  
 ※測定試料は、検量線範囲内に入るように NADP/NADPH Control Buffer で希釈したものを数種類調製してから測定して下さい。

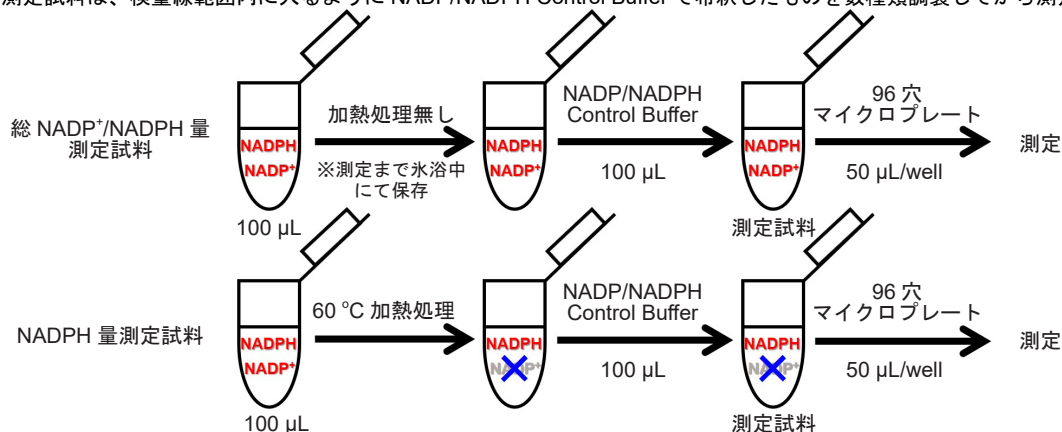


図 3 測定サンプルの調製方法

### 2. Standard solution の調製

- (1) 10 mmol/L Standard stock solution 2 μL を超純水 198 μL で希釈し、100 μmol/L Standard solution を調製する。
- (2) 操作 (1) で調製した 100 μmol/L Standard solution 5 μL をさらに Standard Buffer 495 μL で希釈し、1 μmol/L Standard solution を調製する。さらに順次 2 倍希釈していき、標準液 (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0157, 0 μmol/L) とする (図 4 参照)。

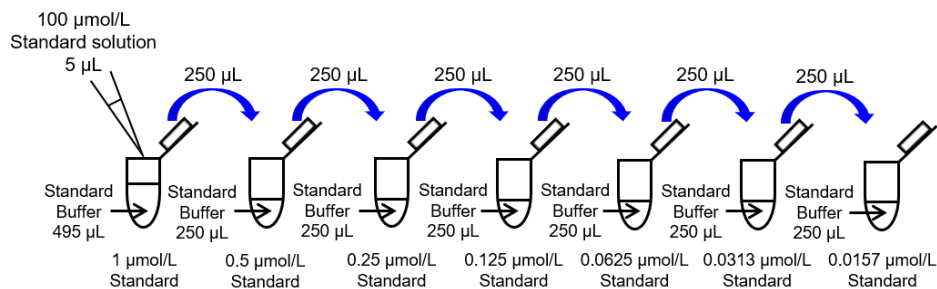


図 4 Standard solution の調製方法

### 3. 測定

- (1) Standard solution および Sample を 50 μL ずつ、各ウェルに入れる (図 5 参照)。  
 ※正確な測定値を得るために、1 つの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルをご使用下さい。
- (2) Working solution 50 μL を各ウェルに入れる。  
 ※ Working solution を加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグを少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用下さい。
- (3) 37 °C で 60 分間インキュベートする。  
 ※インキュベートする際は、溶液の揮発を防ぐため、マイクロプレート用シール等をご使用下さい。
- (4) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。
- (5) 測定試料 (Sample) 中の総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量を検量線より求める。  
 ※これにより求められた値は、調製した測定試料溶液中の濃度です。希釈前の試料中に含まれる濃度は、得られた測定値と試料の希釈倍率より算出して下さい。  
 ※ NADP<sup>+</sup> 量は以下の計算式より算出します。  
 NADP<sup>+</sup> 量 = 総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量 – NADPH 量

	1	2	3	4	5	6
A	0 μmol/L Standard			Sample 1 (総NADP <sup>+</sup> /NADPH量)		
B	0.0157 μmol/L Standard			Sample 1 (NADPH量)		
C	0.0313 μmol/L Standard			Sample 2 (総NADP <sup>+</sup> /NADPH量)		
D	0.0625 μmol/L Standard			Sample 2 (NADPH量)		
E	0.125 μmol/L Standard			Sample 3 (総NADP <sup>+</sup> /NADPH量)		
F	0.25 μmol/L Standard			Sample 3 (NADPH量)		
G	0.5 μmol/L Standard			Sample 4 (総NADP <sup>+</sup> /NADPH量)		
H	1 μmol/L Standard			Sample 4 (NADPH量)		

図 5 Standard solution とサンプルのプレートレイアウト例 (n=3)

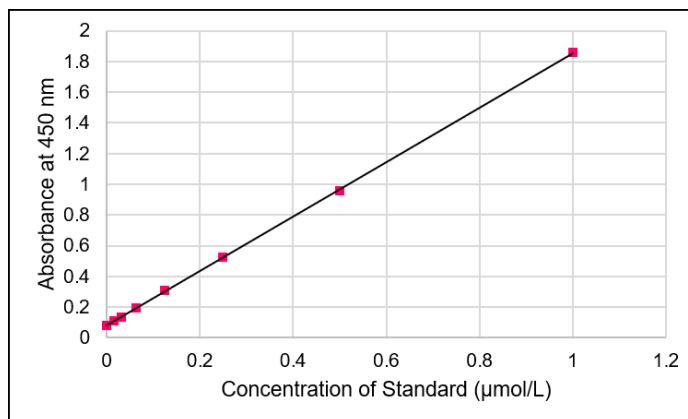


図6 Standard 検量線の例

実験例

Jurkat 細胞中総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量、NADP<sup>+</sup> 量、NADPH 量、NADP<sup>+</sup>/NADPH 比の解析

- (1) Jurkat 細胞 (1.0 および 2.0×10<sup>6</sup> cells/tube) をそれぞれ 1.5 mL マイクロチューブに回収した。
- (2) 300×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。
- (3) PBS 500 μL を加え、ピペッティングにより懸濁後、300×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。
- (4) NADP/NADPH Extraction Buffer 300 μL を加え、ピペッティングにより細胞を溶解した後、12,000×g で 5 分間遠心した。
- (5) 上清 250 μL を MWCO 10K フィルトレーションチューブに移し、12,000×g で 10 分間遠心した。
- (6) 得られた濾液をそれぞれ 1.5 mL マイクロチューブ 2 本に 100 μL ずつ移し、総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量測定試料とした。総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量測定試料は測定まで氷浴中にて保存した。
- (7) NADPH 量測定試料を 60 °C で 60 分間インキュベートし、室温まで冷却した。
- (8) 総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量測定試料が入ったチューブに、NADP/NADPH Control Buffer 100 μL をそれぞれ加え、測定試料とした。
- (9) Standard solution を調製し、標準液を調製した (Standard solution の調製参照)。
- (10) 調製した測定試料および Standard solution を 50 μL ずつ、96 穴プレートに入れた。
- (11) 調製した Working solution 50 μL を各ウェルに加えた。
- (12) 37 °C で 60 分間インキュベートした。
- (13) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定し、測定試料中総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量および NADPH 量を検量線より求めた。NADP<sup>+</sup> 量は、求めた総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量から NADPH 量を引くことにより算出した。

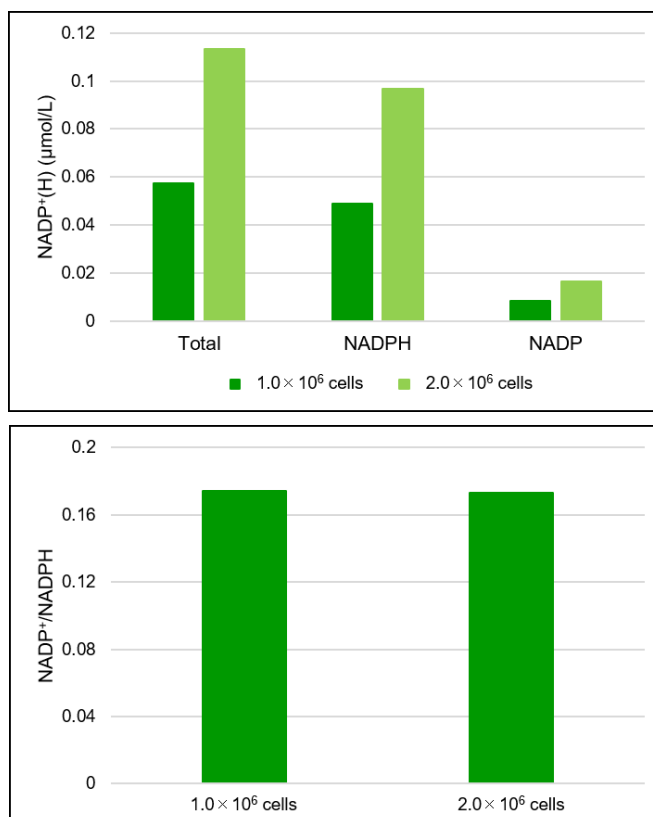


図7 Jurkat 細胞中総 NADP<sup>+</sup>/NADPH 量、NADP<sup>+</sup> 量、NADPH 量および NADP<sup>+</sup>/NADPH 比

参考文献

- 1) Richard L. Veech, *et al.*, *IUBMB Life.*, **2017**, *69*, 305.

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。  
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO** 株式会社同仁化学研究所  
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5  
 熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202  
 Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525  
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)  
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012  
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650  
 フリーダイヤル: 0120-489548  
 フリーファックス: 0120-021557