

辅酶 I NAD(H)含量试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

辅酶 I NAD(H)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，NAD⁺是糖酵解（EMP）和三羧酸循环（TCA）的主要氢受体，生成的 NADH 经呼吸电子链（ETC）传递把电子交给氧，在合成 ATP 的同时，形成大量的 ROS，同时 NADH 再生为 NAD⁺。糖、脂、蛋白质三大代谢物质分解中的氧化反应绝大部分通过这一体系完成。NAD(H)含量和 NADH/NAD⁺比值的高低可用于评价糖酵解和 TCA 循环的强弱。较高的 NAD(H)及 NADH/NAD⁺比值说明细胞呼吸耗氧量较高，处于过氧化状态。此外，NADH/NAD⁺比值升高也可抑制糖酵解和 TCA 循环。另外，NAD⁺降解产物对细胞信号传导、代谢和基因表达等具有重要的调控作用。

测定原理：

分别用酸性和碱性提取液提取样品中 NAD⁺和 NADH，NADH 通过 PMS 的递氢作用，还原

氧化型噻唑蓝（MTT）为甲瓚，在 570nm 下检测吸光值；而 NAD⁺可被乙醇脱氢酶还原为 NADH，进一步采用 MTT 还原法检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

酸性提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存； 碱性提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存； 试剂一：液体 15 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 4 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃保存，用时加入 4mL 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4℃保存一周；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃保存，用时加入 4mL 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4℃保存一周；

试剂五：液体 1.8mL×1 支，4℃保存；

试剂六：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂七：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

NAD⁺和 NADH 的提取：

1 血清（浆）中 NAD⁺和 NADH 的提取

NAD⁺的提取：按照血清（浆）体积（mL）：酸性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取约 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 酸性提取液），95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500 μL 上清液，加入 500 μL 碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

NADH 的提取：按照血清（浆）体积（mL）：碱性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取约 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 碱性提取液），95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500 μL 上清液，加入 500 μL 酸性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2 组织中 NAD⁺和 NADH 的提取：

NAD⁺的提取：按照组织质量（g）：酸性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取约 0.1g 组织，加入 1mL 酸性提取液），冰浴研磨，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500 μL 上清液，加入 500 μL 碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

NADH 的提取：按照组织质量（g）：碱性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取约 0.1g 组织，加入 1mL 碱性提取液），冰浴研磨，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500 μL 上清液，加入 500 μL 酸性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3 细胞或细菌中 NAD⁺和 NADH 的提取：

NAD⁺的提取：先收集细胞或细菌到离心管内，弃上清，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：酸性提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 酸性提取液），超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），95℃水浴 5min

（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心 10min；取 500 μL 上清液，加入 500 μL 碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。**NADH 的提取：**先收集细胞或细菌到离心管内，弃上清，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：碱性提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 碱性提取液），超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），95℃水浴 5min

(盖紧,以防止水分散失);冰浴中冷却后,10000g 4℃离心 10min;取 500 μL 上清液,加入 500 μL 酸性提取液使之中和,混匀,10000g 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 570nm,蒸馏水调零。

2、加样表(在 1.5mL 棕色 EP 管中按下表依次加样):

试剂名称(μL)	对照管	测定管
样本	50	50
试剂一	250	250
试剂二	75	75
试剂三	75	75
试剂四	75	75
试剂五	35	35
试剂六	500	混匀,室温避光静置 20min
试剂六		500

充分混匀,静置 5min 后,20000g,25℃离心 5min,弃上清,沉淀中加入:

试剂七	1000	1000
-----	------	------

混匀,570nm 下比色,读取对照吸光值 A1 和测定管吸光值 A2,计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

注意事项:

1、如果一次性测定样本数较多,可将试剂一、二、三和四按比例配成混合液。

2、对照管和测定管的测定步骤的区别:对照管加完试剂一、二、三、四和五后必须马上加试剂六;测定管加完试剂一、二、三、四和五后必须反应 20min 后再加试剂六。

3、反应过程中注意避光。

4、若 NAD⁺测定中 $\Delta A(A2-A1) \leq 0.0302$,NADH 测定中 $\Delta A(A2-A1) \leq 0.0222$,已低于检测限,可做如下调整(1)将测定管避光静置时间 20min 延长到 60min;(2)在提取阶段增加取样量,即取 0.2g 样本或 0.2mL 样本加入 1mL 提取液。

5、由于每一个测定管需要设一个对照管，本试剂盒 50 管保证测 24 个 NAD⁺或 NADH。

NAD⁺和 NADH 含量的计算:

(一) NAD⁺含量的计算

标准条件下的回归曲线为 $y = 0.295x + 0.0302$, $R^2 = 0.9978$; 其中 y 为 ΔA , x 为 NAD⁺浓度 nmol/mL

1、血清（浆）中 NAD⁺含量计算

$$\text{NAD}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.295 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 67.8 \times (\Delta A - 0.0302)$$

2、组织、细菌或细胞中 NAD⁺含量计算(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.295 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 3.4 \times (\Delta A - 0.0302) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.295 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 6.8 \times (\Delta A - 0.0302) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.295 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.014 \times (\Delta A - 0.0302)$$

(二) NADH 含量的计算

标准条件下的回归曲线为 $y = 0.2808x + 0.0222$, $R^2 = 0.9976$; 其中 y 为 ΔA , x 为 NADH 浓度 nmol/mL

1、血清（浆）中 NADH 含量计算

$$\text{NADH 含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.2808 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 71.2 \times (\Delta A - 0.0222)$$

2、组织、细菌或细胞中 NADH 含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.2808 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 3.6 \times (\Delta A - 0.0222) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.2808 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 7.1 \times (\Delta A - 0.0222) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.2808 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.014 \times (\Delta A - 0.0222)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V2: 加入提取液体积, 2mL; V3: 加入血清（浆） 体积: 0.1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

注意:

最低检测限为 0.1nmol/mL 或 0.1nmol/g 鲜重 或 0.001nmol/mg prot