

辅酶 I NAD(H)含量试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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）为甲瓩，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：

酶标仪、台式离心机、移液器、96 孔板、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 10 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 3 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存，用时加入 3mL 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 3mL 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4℃ 保存一周；

试剂五：液体 3.6mL×1 瓶，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 500μL 上清液，加入 500μL 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 μ L 上清液, 加入 500 μ L 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ C 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 (10^4 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ C 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 (10^4 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 $^{\circ}$ C 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 500 μ L 上清液, 加入 500 μ L 酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 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(μ L)	对照管	测定管
样本	20	20
试剂一	80	80
试剂二	30	30
试剂三	30	30
试剂四	30	30
试剂五	30	30
试剂六	200	混匀, 室温避光静置 20min
试剂六		200

充分混匀, 静置 5min 后, 20000g, 25 $^{\circ}$ C 离心 5min, 弃上清, 沉淀中加入:

试剂七	400	400
-----	-----	-----

混匀, 取 200 μ L 转移至微量石英比色皿或 96 孔板中, 570nm 下读取对照吸光值 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 ΔA (A2-A1) ≤ 0.0302 ，NADH 测定中 ΔA (A2-A1) ≤ 0.0222 ，说明样本中辅酶含量较低，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 100 管保证测 48 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 $y = 0.1475x + 0.0302$ ， $R^2 = 0.9978$ ；其中 y 为 ΔA ，x 为 NAD⁺浓度 nmol/mL

1、血清（浆）中 NAD⁺含量计算

$$\text{NAD}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 135.6 \times (\Delta A - 0.0302)$$

2、组织、细菌或细胞中 NAD⁺含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 6.8 \times (\Delta A - 0.0302) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 13.6 \times (\Delta A - 0.0302) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.027 \times (\Delta A - 0.0302)$$

（二） NADH 含量的计算

标准条件下的回归曲线为 $y = 0.1404x + 0.0222$ ， $R^2 = 0.9976$ ；其中 y 为 ΔA ，x 为 NADH 浓度 nmol/mL

1、血清（浆）中 NADH 含量计算

$$\text{NADH 含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 142.5 \times (\Delta A - 0.0222)$$

2、组织、细菌或细胞中 NADH 含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 7.1 \times (\Delta A - 0.0222) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 14.2 \times (\Delta A - 0.0222) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.028 \times (\Delta A - 0.0222)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.02mL；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