

辅酶 I NAD⁺/NADH 含量检测试剂盒说明书

(货号: PB1022F24 分光法 24 样)

有效期: 3 个月

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 石英比色皿、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 6 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存, 用时加入 6mL 双蒸水, 混匀, 4℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存, 用时加入 6mL 双蒸水, 混匀, 4℃ 保存;

试剂五: 液体 6mL×1 支, -20℃ 保存; 若未能一次用完, 可进行分装, 避免反复冻融;

试剂六: 液体 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂七: 液体 75mL×1 瓶, 4℃ 保存。

NAD⁺ 标准品: 粉剂×1 支, -20℃ 避光保存, 使用前加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NAD⁺ 标准液, 4℃ 可保存 1 周);

NADH 标准品: 粉剂×1 支, -20℃ 避光保存, 使用前加入 1.4 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NADH 标准液, 4℃ 可保存 1 周);

NAD⁺ 和 NADH 的提取

1 血清 (浆) 中 NAD⁺ 和 NADH 的提取

NAD⁺ 的提取: 取约 0.1mL 血清 (浆), 加入 0.5mL 酸性提取液, 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4℃ 离心 10min; 取上清液 200 μL 至另一新的离心管中, 加入等体积的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: 取约 0.1mL 血清 (浆), 加入 0.5mL 碱性提取液, 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4℃ 离心 10min; 取上清液 200 μL 至另一新的离心管中, 加入等体积的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: 称取约 0.1g 组织, 加入 0.5mL 酸性提取液, 冰浴研磨, 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C 离心 10min; 取上清液 200 μl 至另一新的离心管中, 加入等体积的碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

NADH 的提取: 称取约 0.1g 组织, 加入 0.5mL 碱性提取液, 冰浴研磨, 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C 离心 10min; 取上清液 200 μl 至另一新的离心管中, 加入等体积的酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °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 500 万细胞或细菌到离心管内, 弃上清, 加入 0.5mL 酸性提取液, 超声波破碎 1min (强度 20%, 超声 2s, 停 1s), 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C 离心 10min; 取上清液 200 μl 至另一新的离心管中, 加入等体积的碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

NADH 的提取: 先收集 500 万细胞或细菌到离心管内, 弃上清, 加入 0.5mL 碱性提取液, 超声波破碎 1min (强度 20%, 超声 2s, 停 1s), 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C 离心 10min; 取上清液 200 μl 至另一新的离心管中, 加入等体积的酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 570nm, 蒸馏水调零。

2、标准曲线的制备: 使用前分别将 2 μmol/mL NAD⁺标准液和 2 μmol/mL NADH 标准液使用蒸馏水稀释至 20 nmol/mL NAD⁺标准稀释液和 20 nmol/mL NADH 标准稀释液。

名称	NAD ⁺	NADH
稀释前标准品浓度(μmol/mL)	2	2
标准液体积 (μl)	10	10
蒸馏水体积 (μl)	990	990
稀释后标准品浓度(nmol/mL)	20	20

NAD⁺标准曲线的制备:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
标准品浓度(nmol/mL)	10	8	6	4	2	1	0
稀释前标准品浓度 (nmol/mL)	20	20	20	20	20	20	20
标准液体积 (μl)	100	80	60	40	20	10	0
蒸馏水体积 (μl)	100	120	140	160	180	190	200

NADH 标准曲线的制备:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
标准品浓度(nmol/mL)	10	8	6	4	2	1	0
稀释前标准品浓度 (nmol/mL)	20	20	20	20	20	20	20
标准液体积 (μl)	100	80	60	40	20	10	0
蒸馏水体积 (μl)	100	120	140	160	180	190	200

测定步骤(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	标准管 (NAD ⁺ 或 NADH)
样本	50	50	—
标准品	—	—	50
试剂六	500	—	—
试剂一	200	200	200
试剂二	75	75	75
试剂三	75	75	75
试剂四	75	75	75
试剂五	75	75	75
混匀，室温避光静置 20min			
试剂六	—	500	500

充分混匀，静置 5min 后，12000rpm，常温离心 10min，弃上清，沉淀中加入：

试剂七	1000	1000	1000
-----	------	------	------

充分振荡使沉淀完全溶解，取 1ml 转移至石英比色皿中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准；计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ (0nmol/ml 标准品)。注：每个样品均需设一个对照管。

注意事项

- 1、不可将试剂一、二、三和四混合后再加，必须分开加。
- 2、反应过程中注意避光。
- 3、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。
- 4、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

NAD⁺含量的计算

标准曲线的绘制以 NAD⁺各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值 ($\Delta A_{标准}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{测定}$ 带入公式中得到 x (nmol/ml)。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

$$NAD^+ (\text{nmol/mg prot}) = x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{提取}} \div C_{\text{pr}} = x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

$$NAD^+ (\text{nmol/g 鲜重}) = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$

(3) 按液体体积计算：

$$NAD^+ (\text{nmol/ml}) = x \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x$$

(4) 按细菌或细胞数量计算：

$$NAD^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x$$

C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; V_{提取}: 加入提取液体积, 1mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; V_{血清}: 提取时加入血清体积, 0.1ml。

NADH 含量的计算



标准曲线的绘制以 NADH 各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值（ ΔA 标准）为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x（nmol/ml）。

（1）按样本蛋白浓度计算：

$$\text{NADH (nmol/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{提取}} \div \text{Cpr} = x \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算：

$$\text{NADH (nmol/g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$

（3）按液体体积计算：

$$\text{NADH (nmol/ml)} = x \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x$$

（4）按细菌或细胞数量计算：

$$\text{NADH (nmol/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x$$

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL； W: 样品质量，g； V 提取: 加入提取液体积，1mL； 500: 细胞或细菌总数，500 万； V 血清: 提取时加入血清体积，0.1ml。