辅酶Ⅰ NAD+/NADH 含量检测试剂盒说明书

（货号：PB1022W48 微量法 48 样）

有效期：3 个月

测定意义

辅酶INAD(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）为甲瓒，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/酶标仪、台式离心机、移液器、微量石英比色皿/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 5 mL×1 瓶，4℃保存；
试剂三：粉剂×1 瓶，-20 ℃避光保存，用时加入 4mL 双蒸水，混匀，用不完的试剂 4℃避光保存；
试剂四：粉剂×1 瓶，4 ℃避光保存，用时加入 4mL 双蒸水，混匀，用不完的试剂仍 4℃避光保存；
试剂五：液体 3.6mL×1 瓶，-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 30mL×1 瓶，4 ℃保存；
试剂七：液体 50mL×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 ℃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：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 ℃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。

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 ℃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：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 ℃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。

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、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	20	20	—
标准品	—	—	20
试剂六	200	—	—
试剂一	80	80	80
试剂二	30	30	30
试剂三	30	30	30
试剂四	30	30	30
试剂五	30	30	30
混匀，室温避光静置 20min			
试剂六	—	200	200

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	400	400	400

充分振荡使沉淀完全溶解，取 200μL 转移至微量石英比色皿或 96 孔板中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准；计算ΔA 测定=A 测定-A 对照，ΔA 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 100 管保证测 48 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（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：

NAD+（nmol/mg prot）=x×V 提取÷V 提取÷Cpr=x÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

NAD+（nmol/g 鲜重）=x×V 提取÷W=x÷W

（3）按液体体积计算：

NAD+（nmol/ml）=x×（V 提取+V 血清）÷V 血清=11×x

（4）按细菌或细胞数量计算：

NAD+（nmol/10^4 cell）=x×V 提取÷500=0.002×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。

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：

NADH（nmol/mg prot）=x×V 提取÷V 提取÷Cpr=x÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

NADH（nmol/g 鲜重）=x×V 提取÷W=x÷W

（3）按液体体积计算：

NADH（nmol/ml）=x×（V 提取+V 血清）÷V 血清=11×x

（4）按细菌或细胞数量计算：

NADH（nmol/10^4 cell）=x×V 提取÷500=0.002×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。