

辅酶INAD(H)含量检测试剂盒说明书

微釘泛 100管/48样

步引浑宠勃劫忆雯2-3丰颊膀巴奔辉夭龄栽伙偃颊浑宠

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下检测吸光度；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500μL上清液，加入500μL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500μL上清液，加入500μL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：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500μL上清液，加入500μL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(μL)	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℃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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

辅酶INAD(H)含量检测试剂盒说明书 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 $\Delta A (A_2-A_1) \leq 0.0302$ ， $NADH$ 测定中 $\Delta A (A_2-A_1) \leq 0.0222$ ，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

$$NAD^+ \text{含量(nmol/mL)} = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 135.6 \times (\Delta A - 0.0302)$$

2、组织、细菌或细胞中 NAD^+ 含量计算

（1）按样本蛋白浓度计算

$$NAD^+ \text{ (nmol/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V_1] \div (V_1 \times C_{pr}) = 6.8 \times (\Delta A - 0.0302) \div C_{pr}$$

（2）按样本鲜重计算

$$NAD^+ \text{ (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 13.6 \times (\Delta A - 0.0302) \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算

$$NAD^+ \text{ (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.027 \times (\Delta A - 0.0302)$$

（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

$$NADH \text{含量(nmol/mL)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 142.5 \times (\Delta A - 0.0222)$$

2、组织、细菌或细胞中 $NADH$ 含量计算

（1）按样本蛋白浓度计算

$$NADH \text{ (nmol/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V_1] \div (V_1 \times C_{pr}) = 7.1 \times (\Delta A - 0.0222) \div C_{pr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADH (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 14.2 \times (\Delta A - 0.0222) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.028 \times (\Delta A - 0.0222)$$

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