

## 辅酶INAD(H)含量试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

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INAD(H)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，NAD<sup>+</sup>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<sup>+</sup>。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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>比值说明细胞呼吸耗氧量较高，处于过氧化状态。此外，NADH/NAD<sup>+</sup>比值升高也可抑制糖酵解和 TCA 循环。另外，NAD<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>和 NADH 的提取

#### 1 血清（浆）中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的提取

**NAD<sup>+</sup>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），60℃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），60℃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<sup>+</sup>和 NADH 的提取：

**NAD<sup>+</sup>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，60℃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, 60℃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<sup>+</sup>和 NADH 的提取:**

**NAD<sup>+</sup>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<sup>4</sup>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), 60℃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 (10<sup>4</sup>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), 60℃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、临用前将试剂一、二、三和四按以下比例配成混合液, 用多少配多少, 配制后立即使用

试剂名称(μL)	混合液
试剂一	80
试剂二	30
试剂三	30
试剂四	30

**3、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
混合液	170	170
试剂六	200	
试剂五	30	30
充分震荡混匀, 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 μL 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、反应过程中注意避光。
- 2、若 NAD<sup>+</sup>测定中  $\Delta A (A2 - A1) \leq 0.0302$ , NADH 测定中  $\Delta A (A2 - A1) \leq 0.0222$ , 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。
- 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<sup>+</sup>或 NADH。

## NAD<sup>+</sup>和 NADH 含量的计算

### (一) NAD<sup>+</sup>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  $\Delta A$ ,  $x$  为 NAD<sup>+</sup>浓度 nmol/mL

#### 1、血清（浆）中 NAD<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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  $\Delta A$ ,  $x$  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**