

辅酶I NAD(H)含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

规格: 50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存
碱性提取液	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃保存
试剂四	液体 3 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 40 mL×1 瓶	4℃保存
试剂六	液体 75 mL×1 瓶（自备）	常温保存
NAD 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存
NADH 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：需要严格避光；
- 2、试剂六：72 mL 乙醇和 3 mL 蒸馏水混合，备用；
- 3、NAD 标准品：临用前加入 1.5 mL 蒸馏水，即 2 μmol/mL，将其稀释为 1.25 nmol/mL 的 NAD 标准溶液备用；
- 4、NADH 标准品：临用前加入 1.4 mL 蒸馏水，即 2 μmol/mL，将其稀释为 1.25 nmol/mL 的 NADH 标准溶液备用。

产品说明：

辅酶 I 包括还原型和氧化型两种形式，在生物氧化中起传递氢的作用。氧化型辅酶 I 又称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）是脱氢酶的辅酶，它在糖酵解、糖异生、三羧酸循环和呼吸链中发挥着不可替代的作用。中间产物会将脱下的氢递给 NAD，使之成为 NADH（还原型辅酶 I）。而 NADH 则会作为氢的载体，在呼吸链中通过化学渗透偶联的方式，合成 ATP。NAD(H)在机体内有重要的生理意义，与物质代谢、能量代谢、抗细胞衰老、抗氧化以及一些疾病的发生密切相关。体内辅酶 I 含量降低会导致细胞损伤或衰亡。

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）为甲瓖，在 570nm 下检测吸光值，NAD⁺可被乙醇脱氢酶还原为 NADH，进一步采用 MTT 还原法检测。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、NAD⁺和 NADH 的提取（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、血清（浆）中 NAD⁺和 NADH 的提取:

NAD⁺的提取: 取 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)，冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min；取上清 200μL，加入等体积碱性提取液；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

NADH 的提取: 取 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)，冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

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)，冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积碱性提取液混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

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)，冰浴冷却后，10000g 4℃离心 10min，取上清 200μL，加入等体积酸性提取液混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上保存待测。

3、细胞或细菌中 NAD⁺和 NADH 的提取:

NAD⁺的提取: 收集 500 万细胞或细菌，加入 0.5mL 酸性提取液，超声波破碎 1min（强度 20%或 200W，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 200uL 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,冰上保存待测。

NADH 的提取: 收集 500 万细胞或细菌，加入 0.5mL 碱性提取液，超声波破碎 1min（强度 20%或 200W，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 200uL 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,冰上保存待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计预热30分钟以上，调节波长至570nm，蒸馏水调零。

2、 操作表（在1.5mL棕色EP管中按下表依次加样）

试剂名称	对照管(μL)	测定管(μL)	NAD 或 NADH 标准管(μL)	空白管(μL)
上清液	50	50	-	-
标准溶液	-	-	50	-
蒸馏水				50
试剂五	500	-	-	-
试剂一	250	250	250	250
试剂二	75	75	75	75
试剂三	150	150	150	150
试剂四	35	35	35	35
充分混匀，室温避光静置20min				

试剂五	-	500	500	500
充分混匀，静置5min后，15000rpm，25℃离心15min，弃上清，沉淀中加入：				
试剂六	1000	1000	1000	1000

混匀，570nm 下比色，读取吸光值 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管，NAD 标准管的记为 ΔA 标准 1=A 标准管 1-A 空白管。NADH 标准管的记为 ΔA 标准 2=A 标准管 2-A 空白管。（空白管只需做 1-2 次）

三、NAD⁺含量的计算

1、血清（浆）中 NAD⁺含量计算

$$\text{NAD}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div V \text{ 血清} = 12.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}$$

2、组织、细菌、细胞中 NAD⁺含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/mg prot}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times C_{\text{pr}}) = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div C_{\text{pr}}$$

(2)按样本质量计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 质量}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div W = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div W$$

(3)按细菌或细胞数量计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div 500 = 0.0025 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}$$

四、NADH 含量的计算

1、血清（浆）中 NADH 含量计算

$$\text{NADH 含量}(\text{nmol/mL}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div V \text{ 血清} = 12.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}$$

2、组织中 NADH 含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mg prot}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 样品} \times C_{\text{pr}}) = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div C_{\text{pr}}$$

(2)按样本质量计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/g 质量}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div W = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div W$$

(3)按细菌或细胞数量计算

$$\text{NADH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div 500 = 0.0025 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}$$

C 标 NAD 或 NADH 标准溶液的浓度，1.25nmol/mL；C_{pr}:蛋白浓度，mg/mL；V 提取 加入提取液总体积，1mL；V 血清：提取时加入的血清体积，0.1mL；W：样本质量，g；500：500 万个细胞。

注意事项：

- 1、操作过程应避光。不可将试剂一、二、三混合后再加，必须分开加。
- 2、反应过程要注意避光。
- 3、当吸光值大于 1 时，建议稀释后测量，计算公式中应当乘以稀释倍数。

实验实例：

- 1、NAD⁺的提取 称取约 0.1g 肺，按照提取和测定步骤操作，测得计算 $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定} - A \text{ 对照} = 0.341 - 0.321 = 0.02$ ， $\Delta A \text{ 标准 1} = A \text{ 标准 1} - A \text{ 空白} = 1.045 - 0.246 = 0.799$ ，按样本质量计算 NAD⁺ 含量得 $\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 质量}) = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div W = 1.25 \times 0.02 \div 0.799 \div 0.1 = 0.3129 \text{ nmol/g 质量}$ 。

NADH 的提取：称取约 0.1g 肺，按照提取和测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.2-0.136=0.064， ΔA 标准 2=A 标准 2-A 空白=0.687-0.252=0.435，按样本质量计算 NADH 含量得：NADH(nmol/g 质量)= $1.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 2 $\div W=1.25 \times 0.064 \div 0.435 \div 0.1=1.839$ nmol/g 质量。

- 2、NAD⁺的提取：称取约 0.1g 柳树叶，按照提取和测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.259-0.129=0.13， ΔA 标准 1=A 标准 1-A 空白=1.045-0.246=0.799，按样本质量计算 NAD⁺ 含量得：NAD⁺ (nmol/g 质量) = $1.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 1 $\div W=1.25 \times 0.13 \div 0.799 \div 0.1=2.03379$ nmol/g 质量。

NADH 的提取：称取约 0.1g 柳树叶，按照提取和测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.194-0.086=0.108， ΔA 标准 2=A 标准 2-A 空白=0.687-0.252=0.435，按样本质量计算 NADH 含量得：NADH (nmol/g 质量) = $1.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 2 $\div W=1.25 \times 0.108 \div 0.435 \div 0.1=3.1034$ nmol/g 质量。

- 3、NAD⁺的提取：称取约 0.1mL 马血清，按照提取和测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.091-0.061=0.03， ΔA 标准 1=A 标准 1-A 空白=1.045-0.246=0.799，按液体体积计算 NAD⁺ 含量得：NAD⁺含量 (nmol/mL) = $12.5 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 1= $12.5 \times 0.03 \div 0.799=0.4693$ nmol/mL。

NADH 的提取：称取约 0.1mL 马血清，按照提取和测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.126-0.1=0.026， ΔA 标准 2=A 标准 2-A 空白=0.687-0.252=0.435，按液体体积计算 NADH 含量得：NADH 含量 (nmol/mL) = $12.5 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 2= $12.5 \times 0.026 \div 0.435=0.7471$ nmol/mL。