

辅酶I NAD(H)含量检测试剂盒说明书

微量法

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。

货号：BC0315

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
碱性提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.8 mL×1 支	-20℃保存
试剂五	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃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：亮黄色溶液，需要严格避光；
2. NAD 标准品：临用前加入 1.5 mL 蒸馏水溶解，即得 2 $\mu\text{mol/mL}$ NAD 标准品，-20℃可以保存 2 周；
3. 1.25 nmol/mL 的 NAD 标准品：临用前取 25 μL 2 $\mu\text{mol/mL}$ NAD 标准品，加入 975 μL 蒸馏水，配制成 50 nmol/mL NAD 标准品，再取 25 μL 50 nmol/mL NAD 标准品和 975 μL 蒸馏水混合，配制成 1.25 nmol/mL 的 NAD 标准品，现用现配；
4. NADH 标准品：临用前加入 1.4 mL 蒸馏水，即得 2 $\mu\text{mol/mL}$ NADH 标准品，-20℃可以保存 2 周；
5. 1.25 nmol/mL 的 NADH 标准品：临用前取 25 μL 2 $\mu\text{mol/mL}$ NADH 标准品，加入 975 μL 蒸馏水，配制成 50 nmol/mL NADH 标准品，再取 25 μL 50 nmol/mL NADH 标准品和 975 μL 蒸馏水混合，配制成 1.25 nmol/mL 的 NADH 标准品，现用现配。

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老。

分别用酸性和碱性提取液提取样本中 NAD⁺和 NADH，NADH 通过 PMS 的递氢作用，还原氧化型噻唑蓝（MTT）为甲瓏，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。

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。





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、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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 (缠封口膜, 防止爆盖), 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。 (相当于 0.1mL 血清(浆) + 1.1mL 提取液 = 1.2mL 液体体积)

NADH 的提取: 取 0.1mL 血清(浆), 加入 0.5mL 碱性提取液, 煮沸 5min (缠封口膜, 防止爆盖), 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。 (相当于 0.1mL 血清(浆) + 1.1mL 提取液 = 1.2mL 液体体积)

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 (缠封口膜, 防止爆盖), 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。 (相当于 0.1g 组织 + 1mL 提取液)

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 (缠封口膜, 防止爆盖), 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。 (相当于 0.1g 组织 + 1mL 提取液)

3. 细胞或细菌中 NAD⁺和 NADH 的提取:

NAD⁺的提取: 收集 5×10^6 个细胞或细菌, 加入 0.5mL 酸性提取液, 超声波破碎 1min (功率 200W, 超声 2s, 停 1s), 煮沸 5min (缠封口膜, 防止爆盖), 冰浴中冷却后, 10000g 4℃离心 10min, 取上清液 200μL 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。 (相当于 5 百万细胞/细菌 + 1mL 提取液)

NADH 的提取: 收集 5×10^6 个细胞或细菌, 加入 0.5mL 碱性提取液, 超声波破碎 1min (功率 200W, 超声 2s, 停 1s), 煮沸 5min (缠封口膜, 防止爆盖), 冰浴中冷却后, 10000g 4℃离心 10min, 取上清液 200μL 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。 (相当于 5 百万细胞/细菌 + 1mL 提取液)

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至570nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2. 试剂一、试剂二和试剂三需提前平衡至常温。

3. 操作表 (在96孔板/1.5mL EP管中按下表依次加样, 注意全程避光)



试剂名称 (μL)	测定管	NAD 或 NADH 标准管	空白管
上清液	10	-	-
标准溶液	-	10	-
蒸馏水	-	-	10
试剂一	50	50	50
试剂二	15	15	15
试剂三	30	30	30
试剂四	7	7	7
充分混匀，常温避光静置 20min.			
试剂五	100	100	100
混匀，570nm 处测定并读取吸光值，NAD 标准管的记为 ΔA 标准 1=A 标准 1-A 空白，NADH 标准管的记为 ΔA 标准 2=A 标准 2-A 空白。NAD 的记为 ΔA 测定 1=A 测定 1-A 空白，NADH 的记为 ΔA 测定 2=A 测定 2-A 空白。（空白管和标准管只需做 1-2 次） 注意： 1. 试剂三光稳定性较差，因此整个实验过程需严格避光，反应完成后至测定前也需要避光。 2. 若样本数量多，可将试剂一、试剂二和试剂四按比例混合为工作液，操作时先加工作液，再加试剂三，工作液配制后半小时内用完，不可将试剂三与任何试剂混合后再加，必须分开加。			

三、NAD⁺含量的计算

1. 按液体体积计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/mL}) = \Delta A \text{ 测定 1} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 液体} \div V \text{ 血清} \times F = 15 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \times F$$

2. 按样本蛋白浓度计算

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

3. 按样本质量计算

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

4. 按细菌或细胞数量计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^6 \text{ cell}) = \Delta A \text{ 测定 1} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div N \times F = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div N \times F$$

C 标: NAD 标准品的浓度, 1.25nmol/mL; C_{pr}: 蛋白浓度, mg/mL; V 液体: 血清(浆)提取时的总体积, 1.2mL; V 提取: 加入提取液总体积, 1mL; V 血清(浆): 提取时加入的血清(浆)体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞数量, 以 10⁶ 计; F: 稀释倍数。

四、NADH 含量的计算

1. 按液体体积计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mL}) = \Delta A \text{ 测定 2} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 液体} \div V \text{ 血清} \times F = 15 \times \Delta A \text{ 测定 2} \div \Delta A \text{ 标准 2} \times F$$

2. 按样本蛋白浓度计算

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





3. 按样本质量计算

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

4. 按细菌或细胞数量计算

$$\text{NADH (nmol/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \text{ 测定 } 2 \div (\Delta A \text{ 标准 } 2 \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div N \times F = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \times F$$

C 标: NAD 标准品的浓度, 1.25nmol/mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; V 液体: 血清(浆)提取时的总体积, 1.2mL; V 提取: 加入提取液总体积, 1mL; V 血清(浆): 提取时加入的血清(浆)体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞数量, 以 10^6 计; F: 稀释倍数。

注意事项:

1. NAD⁺和 NADH 稳定性较差, 建议使用新鲜样本进行测定。
2. 本实验常温范围需为 20-25°C。
3. 当 A 测定 >1 时, 建议将样本用蒸馏水稀释后重新测定。
4. 提取液会使蛋白变性, 若要以蛋白浓度计算需要重提样本。
5. 每个测定管可以测定 1 个样本的 NAD⁺或 NADH, 本试剂盒 100T 可以测定 96 个样本的 NAD⁺或 NADH。

实验实例:

- 1、**NAD⁺的提取:** 称取约 0.102g 鸡肝, 按照提取步骤操作后, 将上清用蒸馏水稀释 4 倍, 之后按测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A \text{ 测定 } 1 = A \text{ 测定 } 1 - A \text{ 空白} = 0.512 - 0.140 = 0.372$, $\Delta A \text{ 标准 } 1 = A \text{ 标准 } 1 - A \text{ 空白} = 0.478 - 0.140 = 0.338$, 按样本质量计算 NAD⁺ 含量得:
$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 质量}) = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准 } 1 \div W \times F = 1.25 \times 0.372 \div 0.338 \div 0.102 \times 4 = 53.66 \text{ nmol/g 质量}。$$
NADH 的提取: 称取约 0.105g 鸡肝按照提取和测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A \text{ 测定 } 2 = A \text{ 测定 } 2 - A \text{ 空白} = 0.895 - 0.143 = 0.752$, $\Delta A \text{ 标准 } 2 = A \text{ 标准 } 2 - A \text{ 空白} = 0.410 - 0.143 = 0.267$, 按样本质量计算 NADH 含量得:
$$\text{NADH (nmol/g 质量)} = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \div W \times F = 1.25 \times 0.752 \div 0.267 \div 0.105 \times 1 = 33.53 \text{ nmol/g 质量}。$$
- 2、**NAD⁺的提取:** 称取约 0.103g 绿萝, 按照提取和测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A \text{ 测定 } 1 = A \text{ 测定 } 1 - A \text{ 空白} = 0.629 - 0.140 = 0.489$, $\Delta A \text{ 标准 } 1 = A \text{ 标准 } 1 - A \text{ 空白} = 0.478 - 0.140 = 0.338$, 按样本质量计算 NAD⁺ 含量得:
$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 质量}) = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准 } 1 \div W \times F = 1.25 \times 0.489 \div 0.338 \div 0.103 \times 1 = 17.56 \text{ nmol/g 质量}。$$
NADH 的提取: 称取约 0.103g 绿萝, 按照提取和测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A \text{ 测定 } 2 = A \text{ 测定 } 2 - A \text{ 空白} = 0.281 - 0.143 = 0.138$, $\Delta A \text{ 标准 } 2 = A \text{ 标准 } 2 - A \text{ 空白} = 0.410 - 0.143 = 0.267$, 按样本质量计算 NADH 含量得:
$$\text{NADH (nmol/g 质量)} = 1.25 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准 } 2 \div W \times F = 1.25 \times 0.138 \div 0.267 \div 0.103 \times 1 = 6.27 \text{ nmol/g 质量}。$$

参考文献:

- [1] Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences[J]. Antioxidants & redox signaling, 2008, 10(2): 179-206.
- [2] Gibon Y, Larher F. Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium[J]. Analytical biochemistry, 1997, 251(2): 153-157.

相关系列产品:

- BC0440/BC0445 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性检测试剂盒
BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒
BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
BC1100/BC1105 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒

