

辅酶 I NAD(H)测定试剂盒说明书

(货号:A114-1-1 分光光度法 50T/24 样)

一、测定意义:

辅酶 I NAD(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 经电子传递链 (又称呼吸链, ETC) 传递把电子交给氧, 在合成 ATP 的同时, 形成大量的活性氧 (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)含量及 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⁺比值升高液可抑制糖酵解和 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。

二、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) 为甲臜 (Formazan), 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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计及 1mL (1cm 光径) 比色皿、离心机 (20000g)、沸水浴锅、涡旋混匀器、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂盒组成与试剂配制: (假如 NAD⁺和 NADH 都测, 则试剂盒所测样本数减半) (试剂盒有效期 6 个月)

试剂	规格	储存条件
酸性提取液	50mL×1 瓶	4°C
碱性提取液	50mL×1 瓶	4°C
试剂一	15mL×1 瓶	4°C
试剂二	4mL×1 瓶	4°C
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C
	试剂三溶液配置: 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀, 用不完的试剂在 4°C 保存一周	
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C
	试剂四溶液配置: 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀, 用不完的试剂在 4°C 保存一周	
试剂五	1.8mL×1 瓶	4°C
试剂六	30mL×1 瓶	4°C
试剂七	50mL×1 瓶	4°C

五、NAD⁺ 和 NADH 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 0.1mL 血清 (浆), 加入 1mL 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 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 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 0.1mL 血清 (浆), 加入 1mL 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 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 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, 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 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, 煮沸 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 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 1min (冰浴, 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 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 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 1min (冰浴, 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 °C 离心 10min; 取上清液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 °C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、检测步骤:

试剂	测定管	对照管
样品 (μL)	50	50
试剂一 (μL)	250	250
试剂二 (μL)	75	75
试剂三溶液 (μL)	75	75
试剂四溶液 (μL)	75	75
试剂五 (μL)	35	35
试剂六 (μL)		500
混匀, 室温避光静置 20 min;		
试剂六 (μL)	500	
充分混匀, 静置 5 min 后, 20000 g, 常温离心 5 min, 弃上清, 取沉淀 (此沉淀为紫黑色)		
试剂七 (μL)	1000	1000
充分混匀 (混匀后紫黑色沉淀会溶解, 如最后仍有白色或近白色沉淀物, 则需 20000 g, 常温离心 5 min 后取上清读数), 波长 570nm 处, 1cm 光径比色皿, 蒸馏水调零, 测定各管吸光值 A。		

[注]: 分光光度计提前开机预热 30 min 以上;
如果一次性测定样本数较多, 可将试剂一、二、三和四按操作表比例预先混合 (配好后尽快用), 一次性加入; 反应过程中注意避光;
如 A_{测定}/A_{对照} 值很低, 可延长第一次静置时间 (20min) 至 60min;
对多个样本, 每个测定管需对应一个对照管。

七、NAD⁺ 和 NADH 含量计算:

(一) NAD⁺ 含量的计算

1. 血清 (浆) 中 NAD⁺ 含量的计算

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{含量} &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.099) \times 36.1 \div (V_2 \div V_1) \\ (\text{nmol/mL}) & \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.099) \times 722 \end{aligned}$$

W: 样本质量, g;
500: 细胞或细菌总数, 500万。

2. 组织、细菌或细胞中 NAD⁺ 含量的计算

(1) 按照样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{含量} &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.099) \times 36.1 \div (W \div V_1) \\ (\text{nmol/g组织}) & \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.099) \times 72.2 \div W \end{aligned}$$

(2) 按照细菌或者细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{含量} &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.099) \times 36.1 \div (500 \div V_1) \\ (\text{nmol}/10^4 \text{Cells}) & \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.099) \times 0.1444 \end{aligned}$$

V₁: 加入提取液体积, 2mL;

V₂: 加入血清(浆)体积: 0.1mL;

W: 样本质量, g;

500: 细胞或细菌总数, 500万。

(二) NADH 含量的计算

1. 血清(浆)中 NADH 含量的计算

$$\begin{aligned} \text{NADH 含量} &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.065) \times 24.7 \div (V_2 \div V_1) \\ (\text{nmol/mL}) & \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.065) \times 494 \end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADH 含量的计算

(1) 按照样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NADH 含量} &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.065) \times 24.7 \div (W \div V_1) \\ (\text{nmol/g组织}) & \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.065) \times 19.4 \div W \end{aligned}$$

(2) 按照细菌或者细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{NADH 含量} &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.065) \times 24.7 \div (500 \div V_1) \\ (\text{nmol}/10^4 \text{Cells}) & \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - 0.065) \times 0.0988 \end{aligned}$$

V₁: 加入提取液体积, 2mL;

V₂: 加入血清(浆)体积: 0.1mL;