

## 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）为甲瓚，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。

### 组成：

产品名称	CE002-100T/48S	Storage
酸性提取液：液体	50ml	4°C
碱性提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：液体	10ml	4°C
试剂二：液体	3ml	4°C
试剂三：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂四：粉剂	1 瓶	4°C
试剂五：液体	3.6ml	4°C
试剂六：液体	30ml	4°C
试剂七：液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂三：粉剂×1 瓶，-20 °C保存，用时加入 3ml 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4°C保存一周；

试剂四：粉剂×1 瓶，4 °C保存，用时加入 3ml 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4°C保存一周；

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



## 自备仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

## 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），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<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，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<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），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（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），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

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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°C离心 5min, 弃上清, 沉淀中加入:

试剂七	400	400
-----	-----	-----

混匀, 取 200 $\mu$ 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 $\Delta A=A2-A1$ 。

### 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<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。
- 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<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

$$\text{NAD}^+ \text{含量(nmol/ml)} = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 135.6 \times (\Delta A - 0.0302)$$

##### 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

$$\text{NAD}^+ \text{ (nmol/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0302) \div 0.1475 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 6.8 \times (\Delta A - 0.0302) \div Cpr$$

###### (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

$$\text{NADH 含量(nmol/ml)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 142.5 \times (\Delta A - 0.0222)$$

##### 2、组织、细菌或细胞中 NADH 含量计算

###### (1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH (nmol/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 7.1 \times (\Delta A - 0.0222) \div Cpr$$

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司, 保留一切权利



(2)按样本鲜重计算

$$\text{NADH (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 14.2 \times (\Delta A - 0.0222) \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0222) \div 0.1404 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.028 \times (\Delta A - 0.0222)$$

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**

