

辅酶INAD⁺/NADH 含量试剂盒说明书

【货号：BP10009F 分光法 24 样(可测 24 个 NAD⁺,24 个 NADH) 有效期：6 个月】

一、指标介绍

烟酰胺核苷酸的测定一直是细胞或组织在能量转化和氧化还原状态方面的研究热点。NAD⁺是糖酵解（EMP）和三羧酸循环（TCA）的主要氢受体，其 NAD⁺/NADH 比值的高低不仅可用于评价糖酵解和 TCA 循环的强弱，而且在生物物质合成和抗氧化代谢中具有重要调控作用。

本试剂盒提供一种方便，快速的检测方法，提供特异性提取液分别提取样品中的 NAD⁺和 NADH，NADH 在递氢体作用下与一种高灵敏度的显色剂反应生成黄色水溶性甲瓞，在 450nm 下检测，得到 NADH 含量。利用乙醇脱氢酶特异性还原 NAD⁺为 NADH，从而检测 NAD⁺含量。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液 A	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
提取液 B	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1 支	-20℃保存	1. 用前加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 取出 90 μ L 至一新 EP 管中，再加 1.9mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

由于 NAD⁺ 和 NADH 很不稳定，较易降解，尽量使用新鲜样品进行检测。

1、样本提取（制备完成的 NAD⁺/NADH 待测上清液需尽快检测，以免降解）：

① 组织中 NAD⁺和 NADH 的提取：

NAD⁺的提取：取约 0.1g 组织（水分充足样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液 A，冰浴研磨，全部转移到 EP 管中（用提取液 A 补齐到 1mL），植物样本于 95℃孵育 5min 或动物样本于 60℃孵育 30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4 °C 离心 10min；取 500μL 上清液至新 EP 管中，再加 V1 体积的提取液中和（可分次添加提取液 B，调至 PH 约中性，并记录 V1）；12000rpm，4℃离心 5min，取上清液置于冰上待测。

NADH的提取：取约0.1g组织（水分充足样本可取0.5g），加入1mL提取液B，冰浴研磨，全部转移到EP管中（用提取液B补齐到1mL），植物样本于95℃孵育5min或动物样本于60℃孵育30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和（可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2）；12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增加到0.2g等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

② 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：取约500万细菌或细胞加入1ml提取液A，冰浴研磨，全部转移到EP管中（用提取液A补齐到1mL），于60℃孵育30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和（可分次添加提取液B，调至PH约中性，并记录V1）；12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADH 的提取：先收集细胞或细菌到离心管内：取约500万细菌或细胞加入1mL提取液B，冰浴研磨，全部转移到EP管中（用提取液B补齐到1mL），于60℃孵育30min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和（可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2）；12000rpm 4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至1000万等，可做几个梯度选适合本次实验的样本量。

③ 液体中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：取约0.1mL液体至EP管中，再加入1mL提取液A（用提取液A补齐到1.1mL），于95℃孵育5min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和（可分次添加提取液B，调至PH约中性，并记录V1）；12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADH的提取：取约0.1mL液体至EP管中，再加入1mL提取液B（用提取液B补齐到1.1mL），于95℃孵育5min，取出后立即冰浴（或放冰箱）5min；12000rpm 4℃离心10min；取500μL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和（可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2）；12000rpm 4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至0.5mL等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热30min以上，温度设定37℃，调节波长至450nm，蒸馏水调零。

② 在1mL玻璃比色皿中依次加入试剂：

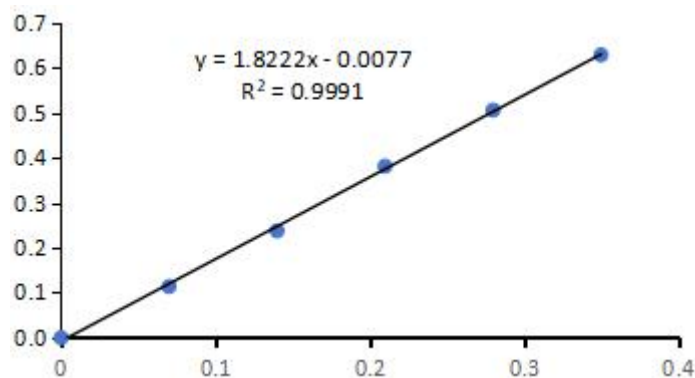
色皿中按下表

试剂组分 (μL)	测定管
样本	70
试剂一	35
试剂二	35
试剂三	530
37℃避光孵育 10min	
试剂四	30
混匀，37℃条件下，立即在450nm处测定吸光值A1，30min后再测定A2，ΔA=A2-A1。	

【注】：若ΔA过小，可加大样本取样质量W；或增加样本量V1（由70增至120μL，则试剂三相应减少），或延长反应时间（如：60min或更长）；则改变后的相应变量需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 1.8222x - 0.0077$ ：x 是 NADH 摩尔质量 (nmol)，y 是 ΔA 。



2、NAD⁺含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ (\text{nmol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 1.8222] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 15.68 \times (\Delta A + 0.0077) \times (0.5 + V_1) \div W \end{aligned}$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 1.8222] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 0.031 \times (\Delta A + 0.0077) \times (0.5 + V_1) \end{aligned}$$

(3)液体中 NAD⁺含量计算：

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{含量} (\text{nmol/mL}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 1.8222] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ &= 156.8 \times (\Delta A + 0.0077) \times (0.5 + V_1) \end{aligned}$$

3、NADH 含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{NADH} (\text{nmol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 1.8222] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 15.68 \times (\Delta A + 0.0077) \times (0.5 + V_2) \div W \end{aligned}$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{NADH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 1.8222] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 0.031 \times (\Delta A + 0.0077) \times (0.5 + V_2) \end{aligned}$$

(3)液体中 NADH 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{NADH 含量} (\text{nmol/mL}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 1.8222] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ &= 156.8 \times (\Delta A + 0.0077) \times (0.5 + V_2) \end{aligned}$$

V 样---加入反应体系中样本体积，0.07mL； V 液---所取液体样本体积：0.1mL；

V3---NAD⁺提取液体积：0.5mL 提取液 A+ V1mL 提取液 B=(0.5+V1)mL；

V4---NADH 提取液体积：0.5mL 提取液 B+ V2mL 提取液 A=(0.5+V2)mL；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 万； NADH 分子量---663.4；

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水 (NADH 不太稳定，取出 NADH 后请尽快使用。如果发现标准曲线不理想，很有可能是标准品发生了降解)，标准品母液浓度为 1 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，1，2，3，4，5 nmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 50nmol/mL 的标品稀释液；						
2. 吸取 50nmol/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 5nmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一 次)
标品	70	
蒸馏水		70
试剂一	35	35
试剂二	35	35
试剂三	530	530
37°C避光孵育 10min		
试剂四	30	30
混匀， 37°C条件下，立即在 450nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		