

NAD/NADH 检测试剂盒说明书

NAD(H) Quantification Assay Kit

分光光度法

货号: AK300

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
酸性提取液	25mL×1 瓶	4℃保存;
碱性提取液	25mL×1 瓶	4℃保存;
AK300-A	15 mL×1 瓶	4℃保存;
AK300-B	4 mL×1 瓶	4℃保存;
AK300-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存, 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀, 剩余试剂 4℃保存一周;
AK300-D	粉剂×1 瓶	4℃保存, 用时加入 4mL 蒸馏水, 混匀, 剩余试剂 4℃保存一周;
AK300-E	1.8mL×1 支	4℃保存;
AK300-F	30mL×1 瓶	4℃保存;
AK300-G	50mL×1 瓶	4℃保存;
NAD 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存, 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;
NADH 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存, 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。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 是一种参与多种氧化还原反应的酶辅因子 (辅酶 I)。NAD 作为电子载体, 在氧化态 (NAD) 和还原态 (NADH) 之间循环。除了在氧化还原反应中的作用外, NAD 在 ADP 核糖基化反应中起着关键作用, 并且是 sirtuins 的底物。辅酶 I NAD(H) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。NAD 参与细胞物质代谢、能量合成、细胞 DNA 修复等多种生理活动, 对机体免疫能力有重要作用。NADH 在维持细胞生长、分化和能量代谢以及细胞保护方面起着重要作用。NAD(H) 含量和 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⁺ 比值升高也可抑制糖酵解和 TCA 循环。

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) 为甲瓖, 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, 通过吸光值变化即可定量检测辅酶 I NAD (H) 的含量。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

NAD⁺ 和 NADH 的提取:

1. 血清 (浆) 中 NAD⁺ 和 NADH 的提取:

(1) 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。

(2) 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⁺和 NADH 的提取:

(1) 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, 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。

(2) 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⁺和 NADH 的提取:

(1) 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), 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。

(2) 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), 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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 570nm, 蒸馏水调零。
2. 在1.5mL 棕色EP 管中按下表依次加入下列试剂

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	NAD 或 NADH 标准管(μL)	空白管 (μL)
样本	50	50		
标准品			50	
蒸馏水				50
AK300-A	250	250	250	250
AK300-B	75	75	75	75
AK300-C	75	75	75	75
AK300-D	75	75	75	75
AK300-E	35	35	35	35
AK300-F	500	混匀, 室温避光静置20min		
AK300-F		500	500	500
充分混匀, 静置 5min 后, 20000g, 25℃离心 5min, 弃上清, 沉淀中加入:				
AK300-G	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)				

注意事项:

1. 对照管和测定管的测定步骤的区别: 对照管加完 AK300-A、B、C、D、E 后必须马上加 AK300-F;

测定管加完 AK300-A、B、C、D、E 后必须反应 20min 后再加 AK300-F。

2. 操作及反应过程中注意避光。
3. 由于每一个测定管需要设一个对照管，本试剂盒 50 管保证测 24 个 NAD⁺ 或 NADH。
4. 最好采用新鲜样本进行测定，以准确反映该指标含量。

NAD⁺和 NADH 含量的计算：

(一) NAD⁺含量的计算：

1. 血清（浆）中 NAD⁺含量计算

$$\text{NAD}^+ \text{ 含量 (nmol/mL) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div V \text{ 血清} = 25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NAD⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+ \text{ (nmol/mg prot) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div (V \text{ 提取} \times C_{pr}) = 2.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div C_{pr}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NAD}^+ \text{ (nmol/g 鲜重) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div W = 2.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1} \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NAD}^+ \text{ (nmol/10}^4 \text{ cell) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div 500 = 0.005 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}$$

(二) NADH 含量的计算：

1. 血清（浆）中 NADH 含量计算

$$\text{NADH 含量 (nmol/mL) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div V \text{ 血清} = 25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH (nmol/mg prot) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div (V \text{ 提取} \times C_{pr}) = 2.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div C_{pr}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADH (nmol/g 鲜重) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div W = 2.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH (nmol/10}^4 \text{ cell) } = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 2} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \times 2 \div 500 = 0.005 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2}$$

注：C 标：NAD 或 NADH 标准溶液的浓度 1.25nmol/mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；2：提取过程中上清液稀释倍数；V 血清：提取时加入的血清体积，0.1mL；W：样本质量，g；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：500 万个细胞。