

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）为甲瓒，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

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

(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

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

(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。