辅酶INAD+/ NADH 含量试剂盒说明书

【微板法 48 样(可测 48 个 NAD^+，和 48 个 NADH）】

一、产品简介

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瓒，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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液A	液体120mL×1瓶	4℃保存	
提取液B	液体120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体μL×1支	-20℃保存	用前用1.1mL蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体μL×1支	-20℃保存	**用前甩几下使液体落入底部，取出50μL至一新EP管中，再加1.1mL蒸馏水混匀备用。**
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	液体1.1mL×1支	4℃保存	
标准品	EP管μg×1支	-20℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、辅酶INAD+/ NADH 含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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、样本制备（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 ℃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 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、 上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，温度设定 37℃，调节波长至 450nm。

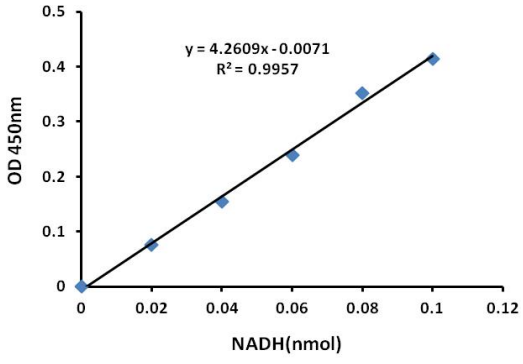
② 在 96 孔板中按下表依次加入试剂：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
37℃避光孵育 10min	
试剂四	10
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 20 增至 40μL，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 = 4.2609x - 0.0071：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：

NAD^+ (nmol/g 鲜重)=[(ΔA+0.0071)÷4.2609]÷(W÷2×V 样÷V3)

=23.47×(ΔA+0.0071)× (0.5+V1)÷W

(2)按细菌或细胞密度计算：

NAD^+ (nmol/10^4 cell)=[(ΔA+0.0071)÷4.2609]÷(500÷2×V 样÷V3)

=0.047×(ΔA+0.0071)× (0.5+V1)

(3)液体中 NAD^+含量计算：

NAD^+含量(nmol/mL)=[(ΔA+0.0071)÷4.2609]÷(V 液÷2×V 样÷V3)

=234.7×(ΔA+0.0071)× (0.5+V1)

3、NADH 含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

NADH (nmol/g 鲜重)=[(ΔA+0.0071)÷4.2609]÷(W÷2×V 样÷V4)

=23.47×(ΔA+0.0071)×(0.5+V2)÷W

(2)按细菌或细胞密度计算：

NADH (nmol/10^4 cell)=[(ΔA+0.0071)÷4.2609]÷(500÷2×V 样÷V4)

=0.047×(ΔA+0.0071)×(0.5+V2)

(3)液体中 NADH 含量计算：

NADH 含量(nmol/mL)=[(ΔA+0.0071)÷4.2609]÷(V 液÷2×V 样÷V4)

=234.7×(ΔA+0.0071) ×(0.5+V2)

V 样---加入反应体系中样本体积，0.02mL； 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 制备标准品母液（1μmol/mL 的 NADH）：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）。

2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。