DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.02.015

技术与方法

NAD⁺的超微量测定法

陈鸿书 彭家和 苏礼民 李蓉芬

（生化教研室）

提 要

本文报导一种简便的、测定组织中NAD⁺含量的超微量法。此法是利用循环的NBT、PMS、乳酸及LDH混合物来测定NAD⁺。这种测定方法简单、快速、灵敏度高，最低可测 1×10^{-11} Mole/ml。

近年来的研究表明，在动物细胞内，NAD⁺除作为脱氢酶的辅酶外，又是P-ADP-核糖合成酶的底物，用以合成P-ADP-核糖，从而参与很多重要的生命过程的调节，如DNA修复[1]，细胞生长[2]，分化[3]及转化[1]等。细胞内NAD⁺含量的变化，可以作为观察P-ADP-核糖合成酶活性的指标，因此，需要建立一种灵敏、准确、简便的方法来测量细胞内的NAD⁺含量。以往已报导了多种测定NAD⁺的方法，如在340nm波长测量NAD•2H的光吸收[4]或将NAD⁺转变为荧光衍生物后测定荧光强度[5]，其灵敏度分别为 5×10^{-6}M及 1×10^{-8} M。酶循环法（enzyme cycling）具有高灵敏度，最低可测 1×10^{-9}M[6]，但该法需要多种酶的制剂，操作复杂。本文参照Nisselbaum等[7]的比色法，结合本室条件，建立以乳酸脱氢酶为催化剂的超微量法，其基本原理如图1所示，在乳酸脱氢酶的催化下乳酸脱下的氢使NAD⁺还原成NAD•2H，最后将氢传递给氯化硝基四氮唑蓝（NBT）从而生成紫蓝色的NBT•2H。此法操作简便，无需特殊设备，灵敏度为 1×10^{-11} Mole/ml。

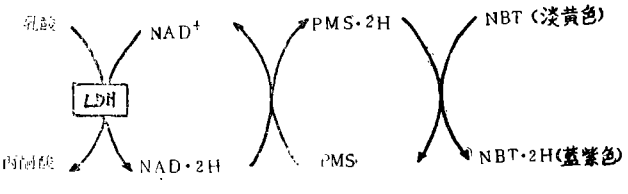


图1 测定NAD⁺的基本原理

材料及方法

一、试剂

1. 氯化硝基四氮唑蓝（NBT）溶液：

NBT是上海前进农场试剂厂产品，用重蒸水配成2.5mg/ml浓度的溶液。

2. 吩嗪硫酸甲酯（PMS）溶液：

PMS是德国Serva产品，用重蒸水配成1 mg/ml浓度的溶液。新鲜的PMS溶液为淡黄色，应避光保存。

3. 磷酸钠缓冲液：

用重蒸水配成0.1M，pH7.4磷酸钠缓冲液，内含0.5M乳酸钠，0.02% Brij-35。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4. 乳酸脱氢酶（LDH）溶液：

LDH是中科院上海生化研究所产品，用重蒸水配成5 mg/ml的溶液。

5. 70%乙醇提取液：

用0.01M，pH7.0的磷酸钾缓冲液配成70%乙醇提取液。

6. NAD^+ 标准溶液：

准确称取NAD^+（上海酵母厂产品，其纯度大于70%）1mg，加适量70%乙醇提取液使之溶解，定容至100ml，作为贮备液，然后按下表稀释成不同浓度。

表1 NAD^+ 标准溶液配制

管号	1	2	3	4	5	6	7
贮备液（ml）	0.64	1.28	1.92	2.56	3.20	3.84	4.48
70%乙醇提取液（ml）	9.36	8.72	8.08	7.44	6.8	6.16	5.52
每管NAD^+含量（μg）	0.0448	0.0896	0.1344	0.1792	0.2240	0.2688	0.3136

注：每管反应溶液体积为3 ml

二、细胞内NAD^+的提取

按MT Korp等[8]的方法略加改良，将培养瓶中的细胞悬液离心除去上清液，用0.9% NaCl溶液洗一次，沉淀的细胞团粒中加入70%乙醇提取液2 ml，混匀，置冰浴中，用UR-200 P型（20KHz），Tomy超声波发生器，以60W破碎细胞30秒钟，在室温振荡20分钟，再以3000×g，4℃离心20分钟，小心吸出上清液备用。

三、NAD^+的测定

所有操作在15℃以下进行，取试管三支，分别加入NBT溶液0.2ml，PMS溶液0.8ml，乳酸脱氢酶溶液0.1ml及磷酸钠缓冲液1.8ml后，置37℃水浴中温育10分钟，分别在测定管中加细胞提取液0.2ml，标准管中加NAD^+标准溶液0.2ml，空白管中加70%乙醇提取液0.2ml。摇匀后置37℃保温15分钟，取出后加2 M HCl 0.1ml以终止反应，于560nm波长用日制岛津分光光度计进行比色。

表2 加标准NAD^+到细胞悬液中的回收率

白细胞数（个/ml）	μg/ml提取液		总μg/ml提取液		回收率（%）
	细胞内含量	加入量	计算量	实测量	
17.6×10^6	0.44	1.4	1.84	1.80	97.33
13.2×10^6	0.32	1.4	1.72	1.76	102.33
8.8×10^6	0.26	1.4	1.66	1.69	101.33

注：①计算量＝细胞内的含量＋加入到细胞悬液中的NAD^+量

②实测量＝样品中加入标准后测定的结果

结果与讨论

一、重复性及回收率

将新鲜大鼠脾脏用生理盐水漂洗干净，剪碎成糊状，以100～200目尼龙布过滤，制成细胞悬液，计数后稀释成不同的细胞浓

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度，测定细胞中 NAD^+含量，进行重复性及回收率实验，结果如表 1 、 2 所示，其变异系数为 2.6%～4.7%，回收率为 102.33～97.83%，说明这种 NAD^+ 的测定法有较好的重复性，系统误差在允许范围以内，是一可靠的测定方法。

二、影响反应的因素

实验证明，温度及 pH 对显色反应均有明显影响。在将反应混合物置 37℃保温之前，各种操作均应在15℃以下进行为宜，温度过高，会出现非特异的颜色反应，以致影响测定结果。从图 2 的结果可见，pH 对灵敏度有明显影响，图中的两条标准曲线是分别在pH7.0及 pH7.4的反应条件下所获的测定结果，前者的斜率比后者为低，说明反应混合物的 pH 越高，灵敏度越大，但经多次实验证明，当反应混合物的 pH 大于 8 时，本底明显升高。pH7.4是最适的反应条件。此外，表 2 的结果表明，延长保温时间，可以提高灵敏度，保温时间最好是限定在 1 小时以内，否则会影响实验结果。

表3 重 复 性 实 验 结 果

细胞浓度（个/ml）	样品数	保温时间（分）	NAD^+含量（μg/ml）	变异系数（%）
6.05×10^6	27	45	0.709±0.018	2.6
17.6×10^6	23	15	0.688±0.032	4.7

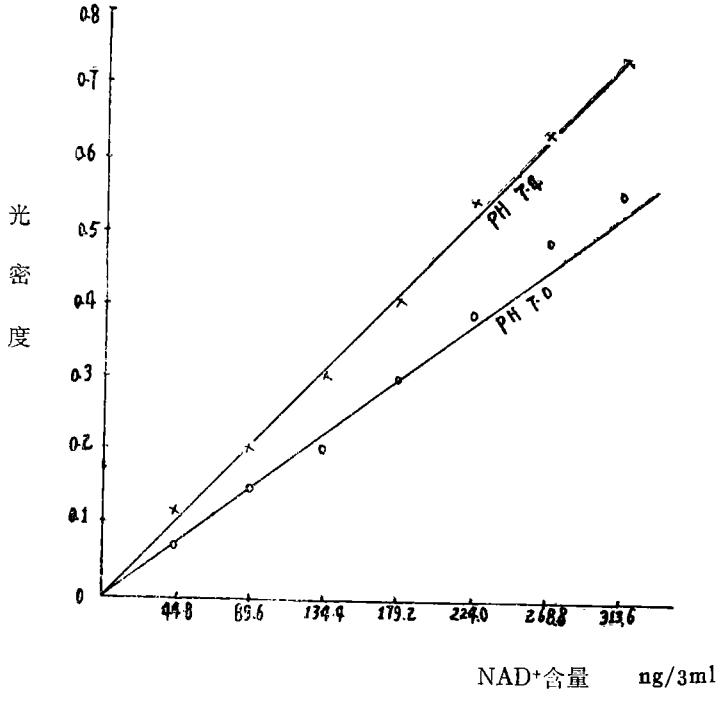


图2 pH对反应灵敏度的影响

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

1. Juarez-Salins H, et al: Nature 1979; 282:740
2. Berger NA, et al: Exp Cell Res 1978; 117:127
3. Caplan AJ, et al: Dev Biol 1979; 72:102
4. Racker EJ: J Biol Chem 1950; 184:313
5. Ciotti MM, et al: in "Methods in Enzymology" (SP Colowick et al, eds) Vol. 3, p.890, Acad Press, New York 1957
6. Lowry OH, et al: J Biol Chem 1961; 236:2746
7. Nisselbaum JS, et al: Anal Biochem 1969; 27:212
8. Karp MT, et al: Anal Biochem 1983; 128:175

Ultramicro-quantitative Determination of Tissue NAD^+

Chen Hongshu, Peng Jiahe, Su Limin, Li Rongfen

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

This article is to report an ultramicro-quantitative method to determine the tissue content of NAD^+. The cycling mixture of nitrotetrazolium blue chloride, phenagene methosulfate, lactate and lactic dehydrogenase is used. The procedure of this assay is very simple and easy to perform. It is sensitive enough to detect as little an amount as 1×10^{-11} mole per ml of NAD^+.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net