

辅酶 I NAD (H) 含量检测试剂盒（可见分光光度法）

注意：正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1099

产品规格：50管/24样

产品简介：

辅酶I包括还原型和氧化型两种形式，在生物氧化中起传递氢的作用。氧化型辅酶I又称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）是脱氢酶的辅酶，它在糖酵解，糖异生，三羧酸循环和呼吸链中发挥着不可替代的作用。中间产物会将脱下的氢递给NAD，使之成为NADH（还原型辅酶 I）。而NADH则会作为氢的载体，在呼吸链中通过化学渗透偶联的方式，合成ATP。NAD(H)在机体内有重要的生理意义，与物质代谢、能量代谢、抗细胞衰老、抗氧化化以及一些疾病的发生密切相关。体内辅酶I含量降低会导致细胞损伤或衰亡。

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）为甲瓚，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。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体15mL×1瓶	2-8℃
碱性提取液	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体16mL×1瓶	2-8℃，避光
试剂四	液体3mL×1瓶	-20℃
试剂五	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂六	自备试剂（提供30mL棕色瓶子）	-
NAD标准品	粉剂×1支	-20℃
NADH标准品	粉剂×1支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂三：需要严格避光；
2. 试剂六：自备试剂，大约需要75mL。将28.8mL乙醇和1.2mL蒸馏水混合（共30mL,30T），常温保存4周；试剂盒内提供一个30mL棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
3. NAD标准品：临用前加入1.5mL蒸馏水，即2μmol/mL，将其稀释为1.25nmol/mL的NAD标准溶液备用；
4. NADH标准品：临用前加入1.4mL蒸馏水，即2μmol/mL，将其稀释为1.25nmol/mL的NADH标准溶液备用。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、NAD⁺和NADH的提取：

1. 血清（浆）中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：取0.1mL血清（浆），加入0.5mL酸性提取液，煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

后, 10000g 4℃离心10min; 取上清200μL, 加入等体积碱性提取液; 混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

NADH的提取: 取0.1mL血清(浆), 加入0.5mL碱性提取液, 煮沸5min(盖紧, 以防止水分散失), 冰浴中冷却后, 10000g 4℃离心10min, 取上清200μL, 加入等体积酸性提取液; 混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

2. 组织中NAD⁺和NADH的提取:

NAD⁺的提取: 称取约0.1g组织, 加入0.5mL酸性提取液, 冰浴研磨, 煮沸5min(缠封口膜, 防止爆盖), 冰浴冷却后, 10000g 4℃离心10min, 取上清200μL, 加入等体积碱性提取液混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

NADH的提取: 称取约0.1g组织, 加入0.5mL碱性提取液, 冰浴研磨, 煮沸5min(缠封口膜, 防止爆盖), 冰浴冷却后, 10000g 4℃离心10min, 取上清200μL, 加入等体积酸性提取液混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

3. 细胞或细菌中NAD⁺和NADH的提取:

NAD⁺的提取: 收集500万细胞或细菌, 加入0.5mL酸性提取液, 超声波破碎1min(功率200W, 超声2s, 停1s), 煮沸5min(缠封口膜, 防止爆盖), 冰浴中冷却后, 10000g 4℃离心10min, 取上清液200μL至另一新的离心管中, 加入等体积的碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

NADH的提取: 收集500万细胞或细菌, 加入0.5mL碱性提取液, 超声波破碎1min(功率200W, 超声2s, 停1s), 煮沸5min(缠封口膜, 防止爆盖), 冰浴中冷却后, 10000g 4℃离心10min, 取上清液200μL至另一新的离心管中, 加入等体积的酸性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4℃离心10min, 取上清, 冰上保存待测。

二、测定步骤:

1. 可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至570nm, 蒸馏水调零。

2. 操作表(在1.5mL棕色EP管中按下表依次加样)

试剂名称	对照管(μL)	测定管(μL)	NAD或NADH标准管(μL)	空白管(μL)
上清液	50	50	-	-
标准溶液	-	-	50	-
蒸馏水	-	-	-	50
试剂五	500	-	-	-
试剂一	250	250	250	250
试剂二	75	75	75	75
试剂三	150	150	150	150
试剂四	35	35	35	35
充分混匀, 室温避光静置20min				
试剂五	-	100	100	100
充分混匀, 静置5min后, 15000rpm, 25℃离心15min, 弃上清, 沉淀中加入:				
试剂六	1000	1000	1000	1000
混匀, 570nm下比色, 读取吸光值ΔA=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。空白管只需做一到两次。				

三、NAD⁺含量的计算

1. 血清(浆)中NAD⁺含量计算

$$\text{NAD}^+\text{含量(nmol/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准1}} \div C_{\text{标}}) \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{血清}} = 12.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准1}}$$

2. 组织、细菌、细胞中NAD⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+ \text{ (nmol/mg prot)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准1}} \div C_{\text{标}}) \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) = 1.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准1}} \div C_{\text{pr}}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

(2) 按样本质量计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 质量}) = \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准1} \div C \text{标}) \times V \text{提取} \div W = 1.25 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准1} \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准1} \div C \text{标}) \times V \text{提取} \div 500 = 0.0025 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准1}$$

四、NADH含量的计算

1. 血清（浆）中NADH含量计算

$$\text{NADH 含量} (\text{nmol/mL}) = \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准2} \div C \text{标}) \times V \text{提取} \div V \text{血清} = 12.5 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准2}$$

2. 组织中NADH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mg prot}) = \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准2} \div C \text{标}) \times V \text{提取} \div (V \text{提取} \times C \text{pr}) = 1.25 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准2} \div C \text{pr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/g 质量}) = \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准2} \div C \text{标}) \times V \text{提取} \div W = 1.25 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准2} \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol}/10^4 \text{cell}) = \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准2} \div C \text{标}) \times V \text{提取} \div 500 = 0.0025 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准2}$$

C标: NAD或NADH标准溶液的浓度, 1.25nmol/mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; V提取: 加入提取液总体积, 1mL; V血清: 提取时加入的血清体积, 0.1mL; W: 样本鲜重, g; 500:500万个细胞。

注意事项:

1. 操作过程应避光。不可将试剂一、二、三和四混合后再加, 必须分开加。
2. 反应过程要注意避光。
3. 当吸光值大于1时, 建议稀释后测量, 计算公式中应当乘以稀释倍数。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com