

## 辅酶 I NAD (H) 含量检测试剂盒 (可见分光光度法)

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<sup>+</sup>)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<sup>+</sup>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,NAD<sup>+</sup>可被乙醇脱氢酶还原为NADH,进一步采用MTT还原法检测。

**注意:实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成:

产品名称	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	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂五	液体3mL×1瓶	-20℃
试剂六	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂七	液体5mL×1瓶(自备)	室温
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:临用前加入6.1mL蒸馏水充分溶解,4℃保存一周;
2. 试剂四:临用前加入6.6mL蒸馏水充分溶解,4℃保存一周;
3. 试剂七:72mL乙醇和3mL蒸馏水混合,备用;
4. 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;
5. 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。

### 自备材料:

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 (仅供参考):

一、NAD<sup>+</sup>和NADH的提取(可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

1. 血清(浆)中NAD<sup>+</sup>和NADH的提取:



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

NAD<sup>+</sup>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<sup>+</sup>和NADH的提取：

NAD<sup>+</sup>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（盖紧，以防止水分散失），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（盖紧，以防止水分散失），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<sup>+</sup>和NADH的提取：

NAD<sup>+</sup>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（强度20%或200W，超声2s，停1s），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（强度20%或200W，超声2s，停1s），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. 分光光度计预热30分钟以上，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
试剂六	500	-	-	-
试剂一	250	250	250	250
试剂二	75	75	75	75
试剂三	75	75	75	75
试剂四	75	75	75	75
试剂五	35	35	35	35
充分混匀，室温避光静置20min				
试剂六	-	500	500	500
充分混匀，静置5min后，15000rpm，25℃离心15min，弃上清，沉淀中加入：				
试剂七	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）

## 三、NAD<sup>+</sup>含量的计算

1. 血清（浆）中NAD<sup>+</sup>含量计算

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

2. 组织、细菌、细胞中NAD<sup>+</sup>含量计算



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

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细菌或细胞数量计算

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

#### 四、NADH含量的计算

1. 血清（浆）中NADH含量计算

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

2. 组织中NADH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细菌或细胞数量计算

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

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: 样本质量, 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