

辅酶 I NAD(H)含量检测试剂盒（微量法）

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：BA1100

产品规格：100管/48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老。

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570 nm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：

酸性提取液：液体25mL×1瓶，4℃保存；

碱性提取液：液体25mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体5mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体1.5mL×1支，4℃保存

试剂三：粉剂×1支，-20℃保存，用时加入1.6mL双蒸水，混匀，4℃保存一周；

试剂四：粉剂×1支，4℃保存，用时加入1.9mL双蒸水，混匀，4℃保存一周；

试剂五：液体0.7mL×1支，4℃保存；

试剂六：液体15mL×1瓶，4℃保存；

试剂七：自备。19.2mL乙醇和0.8mL 蒸馏水充分混合备用。

NAD⁺标准品：粉剂×1瓶，-20℃保存。临用前加入3mL蒸馏水，即1μmol/mL，将其稀释为1.25nmol/mL的NAD标准溶液备用。

NADH标准品：粉剂×1瓶，-20℃保存。临用前加入2.8mL蒸馏水，即1μmol/mL，将其稀释为1.25nmol/mL的NAD标准溶液备用。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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），冰浴冷却后，10000g 4℃离心10min；取上清200uL，加入等体积碱性提取液；混匀，10000g4℃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200uL，加入等体积酸性提取液；混匀，10000g4℃离心10min，取上清，冰上



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

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(盖紧, 以防止水分散失), 冰浴冷却后, 10000g 4℃离心10min, 取上清200uL, 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200uL, 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(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200uL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200uL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、酶标仪调节波长至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	10	10	-	-
标准溶液	-	-	10	-
蒸馏水	-	-	-	10
试剂六	100	-	-	-
试剂一	50	50	50	50
试剂二	15	15	15	15
试剂三	15	15	15	15
试剂四	15	15	15	15
试剂五	7	7	7	7
充分混匀, 室温避光静置20min				
试剂六	-	100	100	100
充分混匀, 静置5min后, 15000rpm, 25℃离心15min, 弃上清, 沉淀中加入:				
试剂七	200	200	200	200
混匀, 取200ul至微量玻璃比色皿或酶标板中, 570nm下比色, 读取吸光值 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, NAD标准管的记为 $\Delta A_{\text{标准1}} = A_{\text{标准管1}} - A_{\text{空白管}}$ 。NADH标准管的记为 $\Delta A_{\text{标准2}} = A_{\text{标准管2}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做一到两次。				

NAD⁺含量的计算

1、血清(浆)中NAD⁺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⁺含量计算

(1)按样本蛋白浓度计算

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

(2)按样本鲜重计算

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



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

(3)按细菌或细胞密度计算

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

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

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

(2)按样本鲜重计算

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

(3)按细菌或细胞密度计算

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

C标：NAD或NADH标准溶液的浓度，1.25nmol/mL；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、当吸光值大于1时，建议稀释后测量。



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