

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0308

Size: 100T/48S

辅酶 I NAD(H) 含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

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。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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。

五、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，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 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。

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。

六、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	空白管
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 $\Delta A=A$ 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。

七、注意事项

- 1、操作过程应避免光。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。

八、NAD⁺含量的计算

1、血清（浆）中 NAD⁺含量计算

$$\begin{aligned}\text{NAD}^+\text{含量 (nmol/mL)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div V \text{ 血清} \\ &= 12.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}\end{aligned}$$

2、组织、细菌、细胞中 NAD⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{NAD}^+ \text{ (nmol/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准 1} \div C \text{ 标}) \times V \text{ 提取} \div (V \text{ 提取} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 1}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

NADH 含量的计算

1、血清（浆）中 NADH 含量计算

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

2、组织中 NADH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

C 标: NAD 或 NADH 标准溶液的浓度, 1.25nmol/mL; 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。