

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-S0576

Size: 50T/24S

辅酶 I NAD(H) 含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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) 为甲瓖，在 570 nm 下检测吸光值， 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：

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。

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	15mL×1 瓶	4℃保存	—
碱性提取液	15mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	用时加入 6.1mL 双蒸水，混匀，4℃保存一周
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入 6.6mL 双蒸水，混匀，4℃保存一周
试剂五	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂六	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂七	自备	—	将 72mL 乙醇和 3mL 蒸馏水充分混合备用
NAD ⁺ 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存	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。
NADH 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存	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。

五、操作步骤:

1、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 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⁺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 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⁺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 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。

2. 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	空白管
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。空白管只需做一到两次。

六、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。

七、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

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

(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

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

$$= 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$= 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准 2} \div W$$

(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; C_{pr}: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。