

辅酶 I NAD(H)含量检测测定试剂盒说明书

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。

货号: BC0310

规格: 50T/24S

产品内容:

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 2umol/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 2umol/mL, 将其稀释为 1.25nmol/mL 的 NAD 标准溶液备用。

产品说明:

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。

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

试验中所需的仪器和试剂:

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。

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	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。

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。

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

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

(3)按细菌或细胞密度计算

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

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

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

(2)按样本鲜重计算

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

(3)按细菌或细胞密度计·算

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

C 标：NAD 或 NADH 标准溶液的浓度，1.25nmol/mL；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。

