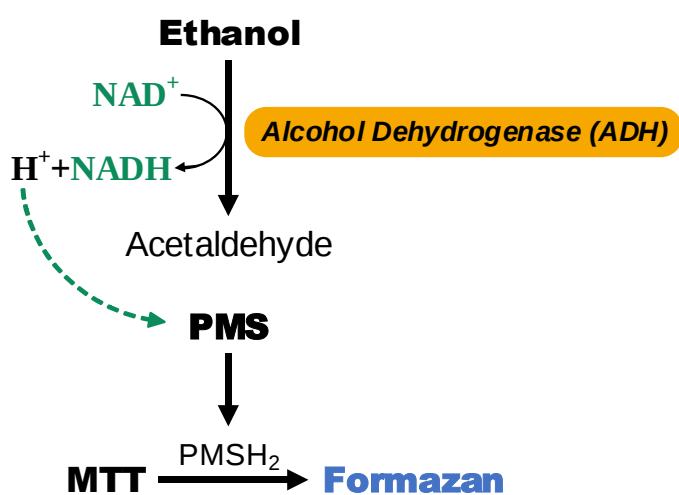




辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒
Coenzyme I NAD (H) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒

Coenzyme I NAD (H) Content Assay Kit

一、产品描述

辅酶I主要分为还原型和氧化型两种形式：氧化型辅酶I 又称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）在糖酵解（EMP）、三羧酸循环（TCA）和呼吸链中作为氢受体发挥着重要作用，并可通过递氢作用形成 NADH（还原型辅酶I），作为氢载体在呼吸链中通过化学渗透偶联的方式合成 ATP。NAD (H) 含量和比值对糖酵解和 TCA 循环过程的评价具有重要意义，并与能量代谢、细胞抗氧化以及一些疾病的发生密切相关。

通过酸性和碱性提取液分别提取样品中 NAD⁺和 NADH，NADH 可通过 PMS 的递氢作用，还原氧化型噻唑蓝（MTT）生成甲瓖，产物在 570 nm 处具有特征吸收峰；NAD⁺可被乙醇脱氢酶还原为 NADH，进一步采用 MTT 还原法生成甲瓖，通过吸光值变化即可定量检测辅酶I NAD (H) 的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存	-
提取液 B	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	液体 80 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C避光保存	使用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 4°C可保存一周)
试剂四	粉剂×2 瓶	4°C避光保存	使用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 4°C可保存一周)
试剂五	粉剂×3 支	-20°C保存	使用前每支试剂五中加入 1 mL 试剂六充分溶解 (现用现配，配制后 4°C可保存一周，严禁-20°C保存)
试剂六	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂七	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存	-
NAD ⁺ 标准品	粉剂×1 支	-20°C避光保存	使用前加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NAD ⁺ 标准液，4°C可保存 1 周)
NADH 标准品	粉剂×1 支	-20°C避光保存	使用前加入 1.4 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 μmol/mL NADH 标准液，4°C可保存 1 周)

需自备试剂：无水乙醇（C₂H₆O，MW = 46.07，CAS: 64-17-5）

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、棕色离心管、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴、无水乙醇和蒸馏水。

1. NAD⁺和 NADH 的提取（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织中 NAD⁺和 NADH 的提取

NAD⁺的提取：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

NADH 的提取：按照组织质量（g）：提取液 B 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 B）处理样品，冰浴匀浆，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 A 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

②细菌或细胞中 NAD⁺和 NADH 的提取

NAD⁺的提取：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

NADH 的提取：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液 B 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 B）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 A 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

③血清（浆）中 NAD⁺和 NADH 的提取

NAD⁺的提取：按照血清（浆）体积（mL）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议吸取 0.1 mL 血清（浆），加入 1 mL 提取液 A）处理样品，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

NADH 的提取：按照血清（浆）体积（mL）：提取液 B 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议吸取 0.1 mL 血清（浆），加入 1 mL 提取液 B）处理样品，95℃处理 5 min（密封以防止水分散失），冰浴冷却至室温，4℃ 15000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液，依次加入 500 μL 试剂一和 500 μL 提取液 A 充分混匀，4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，蒸馏水调零。

②标准稀释液的制备（现用现配）：使用前分别将 2 $\mu\text{mol/mL}$ NAD^+ 标准液和 2 $\mu\text{mol/mL}$ NADH 标准液使用蒸馏水稀释至 1.25 nmol/mL NAD^+ 标准稀释液和 1.25 nmol/mL NADH 标准稀释液。

序号	A	B	C
稀释前浓度 (nmol/mL)	2000	100	5
标准液体积 (μL)	50	50	250
蒸馏水体积 (μL)	950	950	750
稀释后浓度 (nmol/mL)	100	5	1.25

③助溶剂的配制：按照无水乙醇：蒸馏水=24:1 的体积比配制，充分混匀即为助溶剂。

④试剂五应用液的配制（现用现配）：根据使用量按照试剂五：试剂六=1:4 的体积比配制。

⑤在棕色离心管中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 1 (μL)	标准管 2 (μL)	空白管 (μL)
待测样本	20	20	-	-	-
NAD^+ 标准稀释液	-	-	20	-	-
NADH 标准稀释液	-	-	-	20	-
蒸馏水	-	20	-	-	40
试剂一	60	60	60	60	60
试剂二	40	40	40	40	40
试剂三	40	40	40	40	40
试剂四	40	40	40	40	40
试剂五应用液	20	-	20	20	-
充分混匀，室温避光准确反应 20 min					
试剂七	200	200	200	200	200
充分混匀，室温静置 5 min					
15000 g 常温离心 15 min，弃上清，留沉淀					
助溶剂	400	400	400	400	400

吸光值测定：充分振荡使沉淀完全溶解，吸取 200 μL 反应液至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标（ NAD^+ ）、A 标（ NADH ）和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标（ NAD^+ ）= A 标（ NAD^+ ）- A 空白， ΔA 标（ NADH ）= A 标（ NADH ）- A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照管。

3. 辅酶I NAD (H) 含量计算

3.1 NAD⁺含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/mg prot}) = \frac{\text{C 标 (NAD}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NAD}^+) \times \text{Cpr} \times \text{V 提}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标 (NAD}^+)}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/g}) = \frac{\text{C 标 (NAD}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NAD}^+) \times \text{W}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{W} \times \Delta\text{A 标 (NAD}^+)}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{\text{C 标 (NAD}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NAD}^+) \times \text{Cell}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cell} \times \Delta\text{A 标 (NAD}^+)}$$

④按血清（浆）体积计算

$$\text{NAD}^+ (\text{nmol/mL}) = \frac{\text{C 标 (NAD}^+) \times \Delta\text{A 测定} \times (\text{V 提} + \text{V 血清}) \times 3}{\Delta\text{A 标 (NAD}^+) \times \text{V 血清}} = \frac{41.25 \times \Delta\text{A 测定}}{\Delta\text{A 标 (NAD}^+)}$$

3.2 NADH 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mg prot}) = \frac{\text{C 标 (NADH)} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADH)} \times \text{Cpr} \times \text{V 提}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标 (NADH)}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/g}) = \frac{\text{C 标 (NADH)} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADH)} \times \text{W}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{W} \times \Delta\text{A 标 (NADH)}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{NADH} (\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{\text{C 标 (NADH)} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 提} \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADH)} \times \text{Cell}} = \frac{3.75 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cell} \times \Delta\text{A 标 (NADH)}}$$

④按血清（浆）体积计算

$$\text{NADH} (\text{nmol/mL}) = \frac{\text{C 标 (NADH)} \times \Delta\text{A 测定} \times (\text{V 提} + \text{V 血清}) \times 3}{\Delta\text{A 标 (NADH)} \times \text{V 血清}} = \frac{41.25 \times \Delta\text{A 测定}}{\Delta\text{A 标 (NADH)}}$$

注释： C 标 (NAD⁺) 和 C 标 (NADH)：NAD⁺和 NADH 标准稀释液浓度，1.25 nmol/mL；V 提：第一次加入提取液的体积，1 mL；3：提取过程中上清液稀释倍数；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；Cell：细菌或细胞数量，以万计；V 血清：提取过程中加入血清的体积，0.1 mL。

四、注意事项

- ①试剂三和试剂四配制后有效期较短，为便于试验安排，各附赠一瓶作为备用，每瓶均可满足至少 50 个样本的测定；
- ②试剂五配制后未使用完试剂应置于 4℃保存，**严禁-20℃保存**，使用过程中试剂五应用液需置于冰上放置；
- ③2 μmol/mL NAD⁺标准液和 2 μmol/mL NADH 标准液配制后 4℃可保存 1 周，**严禁-20℃保存**；
- ④实验过程中吸取上清液时应避免吸入沉淀物而影响结果的准确性；
- ⑤反应时间对实验结果有较大影响建议精确控制，测定样本较多时建议分批进行测定，以避免组内反应时间不一致对结果造成影响；
- ⑥反应体系中试剂不能按比例配制为混合液使用，必须按反应体系顺序依次加入；
- ⑦若 A 测定大于 1.0，建议将待测样本适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ⑧为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

