

辅酶 I NAD⁺/NADH 含量试剂盒

- 【产品简介】 ◆烟酰胺核苷酸的测定一直是细胞或组织在能量转化和氧化还原状态方面的研究热点。NAD⁺是糖酵解(EMP)和三羧酸循环(TCA)的主要氢受体，其NAD⁺/NADH比值的高低不仅可用于评价糖酵解和TCA循环的强弱，而且在生物物质合成和抗氧化代谢中具有重要调控作用。
- ◆本试剂盒提供一种方便、快速的检测方法，提供特异性提取液分别提取样品中的NAD⁺和NADH，NADH在递氢体作用下与一种高灵敏度的显色剂反应生成黄色水溶性甲瓚，在450nm下检测，得到NADH含量。利用乙醇脱氢酶特异性还原NAD⁺为NADH，从而检测NAD⁺含量。

【货号】 TMC033

【规格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液A	液体120mL×1瓶	4℃	
提取液B	液体120mL×1瓶	4℃	
试剂一	液体uL×1支	-20℃	用前用1.1mL蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体uL×1支	-20℃	用前甩几下使液体落入底部，取出50uL至一新EP管中，再加1.1mL蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃	
试剂四	液体1.1mL×1支	4℃	
标准品	EP管ug×1支	-20℃	若重新做标曲，则用到该试剂。

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备：

①组织中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：取约0.1g组织(水分充足样本可取0.5g)，加入1mL提取液 A，冰浴研磨，全部转移到EP管中(用提取液A补齐到1mL)植物样本于95℃孵育5min或动物样本于60℃孵育30min，取出后立即冰浴(或放冰箱)5min;12000rpm 4℃离心10min;取500uL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和(可分次添加提取液B，调至 PH约中性，并记录V1);12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADH的提取：取约0.1g组织(水分充足样本可取0.5g)，加入1mL提取液B，冰浴研磨，全部转移到EP管中(用提取液B补齐到1mL)，植物样本于95℃孵育5min或动物样本于60℃孵育30min，取出后立即冰浴(或放冰箱)5min;12000rpm 4℃离心10min;取500uL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和(可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2);12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

注：若测出值较低，可加大样本取样量，如增加到0.2g等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

②细胞或细菌中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：先收集细胞或细菌到离心管内:取约500万细菌或细胞加入1ml提取液A，如冰浴研磨，全部转移到EP管中(用提取液A补齐到1mL)，于60℃孵育30min，取出后立即冰浴(或放冰箱)5min;12000rpm 4℃离心10min;取500uL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和(可分次添加提取液B，调至PH约中性，并记录V1);12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADH的提取：先收集细胞或细菌到离心管内:取约500万细菌或细胞加入1mL提取液B，冰浴研磨，全部转移到EP管中(用提取液B补齐1mL)，于60℃孵育30min，取出后立即冰浴(或放冰箱)5min;12000rpm 4℃离心10min;取500uL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和(可分次添加提取液A，调至 PH约中性，并记录V2);12000rpm 4℃离心5min，取上清置于冰上待测。

注：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至1000万等，可做几个梯度选适合本次实验的样本量。

③液体中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：取约0.1mL液体至EP管中，再加入1mL提取液A(用提取液A补齐到1.1mL)，于95℃孵育5min，取出后立即冰浴(或放冰箱)5min;12000rpm 4℃离心10min;取500uL上清液至新EP管中，再加V1体积的提取液中和(可分次添加提取液B，调至PH约中性，并记录V1);12000rpm，4℃离心5min，取上清液置于冰上待测。

NADH的提取：取约0.1mL液体至EP管中，再加入1mL提取液B(用提取液B补齐到1.1mL)，于95℃孵育5min，取出后立即冰浴(或放冰箱)5min;12000rpm 4℃离心10min;取500uL上清液至新EP管中，再加V2体积的提取液中和(可分次添加提取液A，调至PH约中性，并记录V2);12000rpm 4℃离心5min，取上清液置

于冰上待测。

注：若测出值较低，可加大样本取样量，如增至0.5mL等，可做几个梯度选择适合本次实验的样本量。

2、上机测定：

①酶标仪预热30min以上，温度设定37℃，调节波长至450nm。

②在96孔板中按下表依次加入试剂：

试剂名称 (uL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
37℃避光孵育10min	
试剂四	10
混匀，37℃条件下，立即在450nm处测定吸光值A1，30min后再测定A2，AA=A2-A1。	

③标准曲线结果计算①由标准品测定获得，如需重制见随货说明书或咨询。

3、结果计算

①标准曲线： $y=4.2609x-0.0071$ ；x是NADH摩尔质量(nmol)，y是 ΔA 。

②NAD⁺含量的计算

(1)按样本鲜重计算：

$$\text{NAD}^+(\text{nmol/g鲜重}) = [(\Delta A + 0.0071) \div 4.2609] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ = 23.47 \times (\Delta A + 0.0071) \times (0.5 + V_1) \div W$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\text{NAD}^+(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0071) \div 4.2609] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ = 0.047 \times (\Delta A + 0.0071) \times (0.5 + V_1)$$

(3)液体中 NAD⁺含量计算：

$$\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A + 0.0071) \div 4.2609] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_3) \\ = 234.7 \times (\Delta A + 0.0071) \times (0.5 + V_1)$$

③NADH含量的计算：

(1)按样本鲜重计算：

$$\text{NADH}(\text{nmol/g鲜重}) = [(\Delta A + 0.0071) \div 4.2609] \div (W \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ = 23.47 \times (\Delta A + 0.0071) \times (0.5 + V_2) \div W$$

(2)按细菌或细胞密度计算：

$$\text{NADH}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0071) \div 4.2609] \div (500 \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4) \\ = 0.047 \times (\Delta A + 0.0071) \times (0.5 + V_2)$$

(3)液体中 NADH含量计算：

$$\text{NADH含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A + 0.0071) \div 4.2609] \div (V_{\text{液}} \div 2 \times V_{\text{样}} \div V_4)$$

$$=234.7 \times (\Delta A + 0.0071) \times (0.5 + V_2)$$

V样---加入反应体系中样本体积，0.02mL； V液---所取液体样本体积:0.1mL；

V3---NAD⁺提取液体积:0.5mL 提取液A + V₁mL提取液B=(0.5+V₁) mL；

V4---NADH提取液体积:0.5mL 提取液B + V₂mL提取液A=(0.5+V₂) mL；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 万；

NADH 分子量---663.4；

- 【注意事项】**
- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
 - 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。