

辅酶 I NAD(H) 检测试剂盒（微量法）

货号：PMK0999

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

检测范围：0.78 μ M-50 μ M 灵敏度：0.78 μ M

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）

产品简介

辅酶 I NAD(H) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，包括 NAD⁺ (氧化型) 和 NADH (还原型) 两种形式。NAD⁺ 是糖酵解 (EMP) 和三羧酸循环 (TCA) 的主要氢受体，生成的 NADH 经呼吸电子链 (ETC) 传递把电子交给氧，在合成 ATP 的同时，形成大量的 ROS，同时 NADH 再生为 NAD⁺。糖、脂、蛋白质三大代谢物质分解中的氧化反应绝大部分通过这一体系完成。NAD⁺ 在细胞和体内发挥着重要的功能，其合成和降解及其产物参与细胞凋亡、代谢调控和基因表达的调控等，并且 NAD⁺ 的减少是细胞死亡的主要因素之一。NAD⁺ 在调节细胞氧化还原状态方面的重要性以及调控信号通路及转录方面的功能，使得 NAD⁺ 及其合成和消耗的酶成为多种疾病的潜在药物靶点。本试剂盒提供了一种简单的比色法来检测细胞、组织或其它样品中 NAD⁺ (氧化型辅酶 I) 和 NADH (还原型辅酶 I) 各自的量。其原理是分别用酸性和碱性提取液提取样品中 NAD⁺ 和 NADH，基于酶循环反应（不识别 NADP⁺/NADPH），在这一反应过程中 NAD⁺ 被还原为 NADH，NADH 将 WST-8 还原生成橙黄色 formazan（甲臞），在 450nm 左右检测有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中总的 NAD⁺ 或 NADH 的总量呈正比关系。

NOX 能够将 NADH 氧化为 NAD，NADH 的氧化与 2,6 二氯酚靛蓝 (DCPIP) 的还原相偶联，

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
反应缓冲液	5mL	10mL	4℃
试剂一	1mL	2mL	4℃
试剂二	300 μ L	600 μ L	-20℃避光保存
试剂三	60 μ L	120 μ L	-20℃避光保存
试剂四	120 μ L	240 μ L	-20℃保存
NAD 标准品 (10mM)	100 μ L	100 μ L	-20℃保存
NAD (酸性) 提取液	50mL	100mL	4℃
NADH (碱性) 提取液	50mL	100mL	4℃

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 450nm 处的吸光度）

水浴锅、制冰机，低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿，可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

产品说明书

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装保存于-20℃。

试剂三：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装保存于-20℃。

试剂四：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；-20℃保存。

NAD（酸性）提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

NADH（碱性）提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

工作液配制：测定孔和标准孔每孔配制 85μL 测定工作液，现配现用。吸取 67μL 反应缓冲液，2μL 试剂四，5μL 试剂二，1μL 试剂三混合后，室温孵育 5min，再加入 10μL 试剂一。

对照孔每孔配制 85μL 对照工作液：吸取 79μL 反应缓冲液，5μL 试剂二，1μL 试剂三。

NAD 标准曲线设置：取 5μL 10mM 的 NAD 用 995μL 反应缓冲液稀释至 1mL 50μM NAD 预混物。按下表所示，进行下一步稀释：

	标准品体积	反应缓冲液 (μL)	浓度 (μM)
Std. 1	5μL 10mM NAD	995	50
Std. 2	100μL of Std. 1 (50μM)	100	25
Std. 3	100μL of Std. 2 (25μM)	100	12.5
Std. 4	100μL of Std. 3 (12.5μM)	100	6.25
Std. 5	100μL of Std. 4 (6.25μM)	100	3.13
Std. 6	100μL of Std. 5 (3.13μM)	100	1.56
Std. 7	100μL of Std. 6 (1.56μM)	100	0.78

注意：每次实验，请使用新配制的标准品，NAD 标准品（10mM）分装保存于-20℃。

样本制备

组织中 NAD⁺和 NADH 的提取：

NAD⁺的提取：称取 0.1g 组织，加入 1mL NAD（酸性）提取液，冰浴匀浆，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10,000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 碱性提取液使之中和，混匀，10,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

NADH 的提取：称取 0.1g 组织，加入 1mL NADH（碱性）提取液，冰浴匀浆，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10,000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 酸性提取液使之中和，混匀，10,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

细胞或细菌中 NAD⁺和 NADH 的提取：

NAD⁺的提取：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，低速 600g 离心 5min，弃上清液，加入 1mL NAD（酸性）提取液，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10,000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 碱性提取液使之中和，混匀，10,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

NADH 的提取：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，低速 600g 离心 5min，弃上清液，加入 1mL NADH（碱性）提取液，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10,000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 酸性提取液使之中和，混匀，10,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

血清（浆）中 NAD⁺和 NADH 的提取

NAD⁺的提取：吸取 0.1mL 血清（浆），加入 0.9mL NAD（酸性）提取液，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10,000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 碱性提取液使之中和，混匀，10,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

产品说明书

NADH 的提取：吸取 0.1mL 血清（浆），加入 0.9mLNADH（碱性）提取液，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10,000g 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 酸性提取液使之中和，混匀，10,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 6 个月。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 450nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中按照如下方式加样：

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)
反应缓冲液	40	0	0	0
不同浓度标准品	0	40	0	0
样本	0	0	40	40
测定工作液	80	80	80	0
对照工作液	0	0	0	80

3. 充分混匀，室温孵育 30min，测定 450nm 处的吸光值 A。计算 $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{对照}$ 、 $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管只需做 1 管。

注意：1. 该分析基于酶催化的动力学反应，工作液的加入需要迅速，各组分需要彻底混合。

2. 为避免干扰实验，样本中应避免有如下物质存在：EDTA (>0.5 mM)，ascorbic acid, SDS (>0.2%)，sodium azide, NP-40 (>1%) 及 Tween-20 (>1%)。

3. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验，如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.001 可适当加大样本量，如果 $A_{测}$ 大于 2.0，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{测}$ 代入标准曲线来计算样本中 NAD/NADH 的浓度 y (μM 即 nmol/mL)。

2. 测定 NAD/NADH 含量的计算公式

1) 按样本质量计算：

$$\text{NAD/NADH (nmol/g)} = (y \times V_{样}) \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times n = y \div W \times n$$

2) 按细菌或细胞数量计算：

$$\text{NAD/NADH (nmol/10}^4 \text{ Cells)} = (y \times V_{样}) \div (\text{细胞数量} \times V_{样} \div V_{样总}) \times n = y \div 500 \times n = 0.002y \times n$$

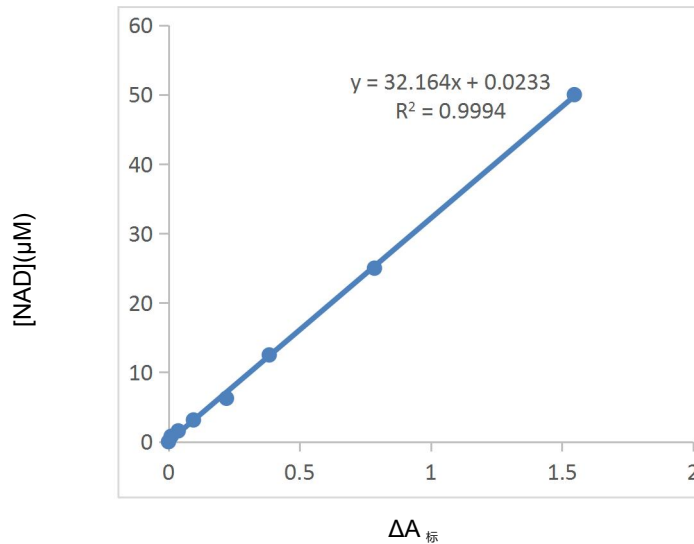
3) 按液体体积计算：

$$\text{NAD/NADH (nmol/mL)} = (y \times V_{样}) \div V_{样} \times 10 \times n = 10y \times n$$

$V_{样}$ ：加入样本体积，0.04 mL； $V_{样总}$ ：提取体系总体积，1mL；W：样本质量，0.1g；500：细胞数量，500 万；n：样本进一步稀释倍数；10：提取液体时的稀释倍数，(0.1mL+0.9mL)/0.1mL=10。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意：在这些浓度下，NAD 和 NADH 的标准曲线是相同的。此说明书中，我们仅提供 NAD 标准曲线。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1004 NADH 氧化酶 (NOX) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1000 NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1005 柠檬酸合酶 (CS) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1011 辅酶 II NADP(H) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

