



辅酶 I NAD(H)含量检测试剂盒(WST 显色法)

中文名称：辅酶 I NAD(H)含量检测试剂盒(WST 显色法)

英文名称：Coenzyme I NAD(H) Content Assay Kit (WST colorimetry)

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
酸性提取液	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 2mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.9mL×1 支	-20℃保存
试剂五	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
NAD 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存
NADH 标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

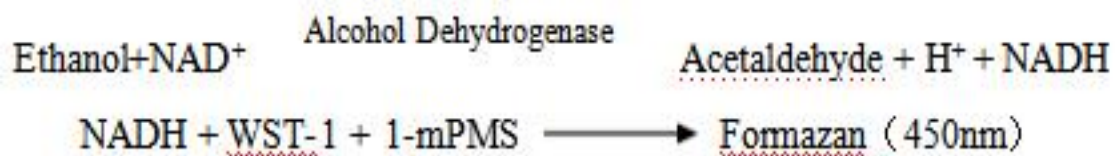
溶液的配制：

- 1、NAD 标准品：临用前加入 1.5mL 蒸馏水，即 2 μ mol/mL。-20℃可以保存 2 周。
- 2、NADH 标准品：临用前加入 1.4mL 蒸馏水，即 2 μ mol/mL。-20℃可以保存 2 周。

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本中 NAD⁺和 NADH, 在 1-mPMS 作用下, WST-1 可与 NADH 反应, 产生水溶性 formazan, 在 450nm 下有特征吸收峰, 而 NAD⁺可被乙醇脱氢酶还原为 NADH, 进一步采用 WST-1 检测。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅, 研钵/匀浆器、超声破碎仪、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1、血清(浆)中 NAD⁺和 NADH 的提取:

NAD⁺的提取: 建议取 0.1mL 血清(血浆), 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°C离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入 200 μ L 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g4°C离心 10min, 取上清, 冰上待测。

NADH 的提取: 建议取 0.1mL 血清(血浆), 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°C离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入 200 μ L 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g4°C离心 10min, 取上清, 冰上待测。

2、组织中 NAD⁺和 NADH 的提取:

NAD⁺的提取: 建议取 0.1g 组织质量, 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°C离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入 200 μ L 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g4°C离心 10min, 取上清, 冰上待测。

NADH 的提取: 建议取 0.1g 组织质量, 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°C离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入 200 μ L 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g4°C离心 10min, 取上清, 冰上待测。

3、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, 离心弃上清, 建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 酸性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 停 10s, 重复 30 次), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g, 4°C离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入 200 μ L 碱性提取液使之中和; 混匀, 10000g4°C离心 10min, 取上清, 冰上待测。

NADH 的提取: 建议 500 万细胞或者细菌加入 0.5mL 碱性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 停 10s, 重复 30 次), 煮沸 5min(盖紧, 以防止水分散失); 冰浴冷却后, 10000g, 4°C离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入 200 μ L 酸性提取液使之中和; 混匀, 10000g4°C离心 10min, 取上清, 冰上待测。

二、测定步骤



- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、NAD⁺标准品：用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0nmol/mL 的标准溶液，0nmol/mL 即空白管。
- 3、NADH 标准品：用蒸馏水稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0nmol/mL 的标准溶液，0nmol/mL 即空白管。
- 4、稀释表（附于说明书最后）
- 5、在 EP 管中按顺序加入下列试剂：

试剂名称(μL)	对照管(A1 、 A1 ')	测定管(A2 、 A2 ')	标准管(A 标)
上清液	10	10	
标准品	-	-	10
试剂五	100	-	-
试剂一	50	50	50
试剂二	15	15	15
试剂三	30	30	30
试剂四	7	7	7
充分混匀， 室温避光反应 1h			
试剂五	-	100	100

混匀，450nm 下比色，读取吸光值，NAD⁺ 的记为： $\Delta A_{\text{NAD}} = A_2 - A_1$ ，NADH 的记为 $\Delta A_{\text{NADH}} = A_2' - A_1'$ ，NAD 标准管的记为 $\Delta A_{\text{NAD 标}} = A_{\text{标}} - A_{\text{空白管}}$ 。NADH 标准管的记为 $\Delta A_{\text{NADH 标}} = A_{\text{标}}' - A_{\text{空白管}}$ 。（标准曲线只需做 1-2 次，每个测定管需设一个对照管）

三、NAD⁺和 NADH 含量计算

1、标准曲线绘制：

(1) NAD⁺标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度(x_1 ，nmol/mL)和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y_1 ， $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准



曲线, 将 ΔA 测定代入方程得到 x_1 (nmol/mL)。

(2) NADH 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度(x_2 , nmol/mL)和吸光度 ΔA 标准(y_2 , ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A'$ 代入方程得到 x_2 (nmol/mL)。

2、NAD⁺和 NADH 含量计算

(一) NAD⁺含量计算

(1) 按液体体积计算: $\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol/mL}) = x_1 \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x_1$

(2) 按样本蛋白浓度计算 $\text{NAD}^+(\text{nmol/mgprot}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) = x_1 \div \text{Cpr}$

(3) 按样本鲜重计算 $\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div W = x_1 \div W$

(4) 按细胞数量计算: $\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = x_1 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADH 含量计算

(1) 按液体体积计算: $\text{NADH 含量}(\text{nmol/mL}) = x_2 \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}} = 11 \times x_2$

(2) 按样本蛋白浓度计算 $\text{NADH}(\text{nmol/mgprot}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) = x_2 \div \text{Cpr}$

(3) 按样本鲜重计算 $\text{NADH 含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div W = x_2 \div W$

(4) 按细胞数量计算: $\text{NADH 含量}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = x_2 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_2$

$V_{\text{提取}}$: 加入提取液体积, 1mL; $V_{\text{血清}}$: 血清(浆)体积, 0.1mL; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

2. 注意事项:

1、反应过程中注意避光。

2、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。同步修改计算公式。

实验实例:

1、**NAD⁺的测定**: 称取 0.1g 冬青叶片, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.119 - 0.106 = 0.013, 标准曲线 $y_1 = 0.373x + 0.0012$, 根据标曲得出 $x_1 = 0.032$, NAD⁺含量得:

$NAD^+(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div W = 0.32 \text{nmol/g 质量}$ 。

NADH 的测定: 称取 0.1g 冬青叶片, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.172 - 0.128 = 0.044, 标准曲线 $y_2 = 0.1479x$, 根据标曲得出 $x_2 = 0.297$, NADH 含量得:

$NADH(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 2.97 \text{nmol/g 质量}$ 。

2、**NAD⁺ 的测定**: 称取 0.1g 小鼠肝脏, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.119 - 0.105 = 0.014, 标准曲线 $y_1 = 0.373x + 0.0012$, 根据标曲得出 $x_1 = 0.034$, NAD⁺ 含量得:

$NAD^+(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div W = 3.4 \text{nmol/g 质量}$ 。

NADH 的测定: 称取 0.1g 小鼠肝脏, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.145 - 0.112 = 0.033, 标准曲线 $y_2 = 0.1479x$, 根据标曲得出 $x_2 = 0.223$, NADH 含量得:

$NADH(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 2.23 \text{nmol/g 质量}$ 。

3、**NAD⁺的测定**: 取 0.1mL 马血清, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.114 - 0.097 = 0.017, 标准曲线 $y_1 = 0.373x + 0.0012$, 根据标曲得出 $x_1 = 0.042$, NAD⁺含量得:

$NAD^+(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div W = 0.42 \text{nmol/g 质量}$ 。

NADH 的测定: 取 0.1mL 马血清, 按提取步骤提取后按照测定步骤操作, 玻璃比色皿测得吸光值后计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.142 - 0.135 = 0.007, 标准曲线 $y_2 = 0.1479x$, 根据标



曲得出 $x_2=0.047$ ，NADH 含量得： $NADH(\text{nmol/g 质量})=x_2 \div W=0.47\text{nmol/g 质量}$ 。

标准溶液稀释表：

NADP⁺标准品稀释表

序 号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积((μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	2000	10	990	50
2	50	100	900	2
3	2	250	150	1.25
4	1.25	200	200	0.625
5	0.625	200	200	0.3125
6	0.3125	200	200	0.15625
7	0.15625	200	200	0.078
8	0.078	200	200	0.039
9	0.039	200	200	0.0195
10	0	0	200	0

NADPH 标准品稀释表

序 号	稀释前浓度(nmol/mL)	标准液体积((μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(nmol/mL)
1	2000	5	995	10
2	10	200	200	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25
5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125
7	0.3125	200	200	0.15625
8	0.15625	200	200	0.078
9	0	0	200	0