



辅酶 I NAD(H)含量检测试剂盒(可见分光光度法)(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)

储存条件：-20℃

产品包装：盒装

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品规格：50T/24S

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
酸性提取液	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
酸性提取液	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 40mL×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：

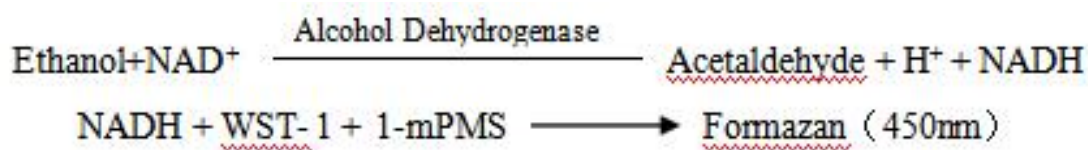
- 1、NAD 标准品：临用前加入 1.5mL 蒸馏水，即 2μmol/mL。-20℃可以保存 2 周。
- 2、NADH 标准品：临用前加入 1.4mL 蒸馏水，即 2μmol/mL。-20℃可以保存 2 周。

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、低温离心机、水浴锅，研钵/匀浆器、超声破碎仪、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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℃离心10min;取200μL上清液,加入200μL碱性提取液使之中和;混匀,10000g4℃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℃离心10min;取200μL上清液,加入200μL酸性提取液使之中和;混匀,10000g4℃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℃离心10min;取200μL上清液,加入200μL碱性提取液使之中和;混匀,10000g4℃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℃离心10min;取200μL上清液,加入200μL酸性提取液使之中和;混匀,10000g4℃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℃离心10min;取200μL上清液,加入200μL碱性提取液使之中和;混匀,10000g4℃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℃离心10min;取200μL上清液,加入200μL酸性提取液使之中和;混匀,10000g4℃离心10min,取上清,冰上待测。

二、测定步骤



- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- 2、NAD 标准品：用蒸馏水稀释为 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.019、0nmol/mL 的标准溶液。0nmol/mL 即为空白管(A 空)。
- 3、NADH 标准品：用蒸馏水稀释为 0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.019、0nmol/mL 的标准溶液。0nmol/mL 即为空白管(A 空)。
- 4、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	20
	20	30	930	0.625
2	0.625	400	400	0.3125
3	0.3125	400	400	0.15625
4	0.15625	400	400	0.078
5	0.078	400	400	0.039
6	0.039	400	400	0.019
7	0	0	400	0

- 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	50	50	
标准品	-	-	50
试剂五	500	-	-
试剂一	250	250	250
试剂二	75	75	75
试剂三	150	150	150
试剂四	35	35	35



充分混匀，室温避光反应 1h			
试剂五	-	500	500

混匀,450nm 下比色,读取吸光值,NAD⁺ 的记为:ΔA_{NAD}=A₂-A₁,NADH 的记为ΔA_{NADH}=A₂'-A₁', NAD 标准管的记为ΔA_{AD 标}=A_标-A 空白管。NADH 标准管的记为ΔA_{NADH 标}=A_标'-A 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(x₁, nmol/mL)和吸光度ΔA 标准(y₁, ΔA 标准),建立标准曲线。根据标准曲线,将ΔA 测定代入方程得到 x₁(nmol/mL)。

(2) NADH 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度(x₂, nmol/mL)和吸光度ΔA 标准(y₂, ΔA 标准),建立标准曲线。根据标准曲线,将ΔA'代入方程得到 x₂(nmol/mL)。

2、NAD⁺和 NADH 含量计算

(一) NAD⁺含量计算

- (1) 按液体体积计算: NAD⁺含量(nmol/mL)=x₁×(V 提取+V 血清)÷V 血清=11×x₁
- (2) 按样本蛋白浓度计算 NAD⁺(nmol/mgprot)=x₁×V 提取÷(V 提取×Cpr)=x₁÷Cpr
- (3) 按样本鲜重计算 NAD⁺含量(nmol/g 质量)=x₁×V 提取÷W=x₁÷W
- (4) 按细胞数量计算: NAD⁺含量(nmol/104cell)=x₁×V 提取÷500=0.002×x₁

(二)NADH 含量计算

- (1) 按液体体积计算: NADH 含量(nmol/mL)=x₂×(V 提取+V 血清)÷V 血清=11×x₂
- (2) 按样本蛋白浓度计算 NADH(nmol/mgprot)=x₂×V 提取÷(V 提取×Cpr)=x₂÷Cpr



(3) 按样本鲜重计算 NADH 含量(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：NADH 含量(nmol/10⁴cell)= $x_2 \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x_2$

V 提取：加入提取液体积，1mL；V 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.113 - 0.089 = 0.024$ ，标准曲线 $y_1 = 0.5982x + 0.0038$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.034$ ，NAD⁺含量得：

NAD⁺(nmol/g 质量)= $x_1 \div W = 0.34 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.250 - 0.168 = 0.082$ ，标准曲线 $y_2 = 0.4452x - 0.0008$ ，根据标曲得出 $x_2 = 0.186$ ，NADH 含量得：

NADH(nmol/g 质量)= $x_2 \div W = 1.86 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.068 - 0.045 = 0.019$ ，标准曲线 $y_1 = 0.5982x + 0.0038$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.025$ ，NAD⁺ 含量得：

NAD⁺(nmol/g 质量)= $x_1 \div W = 0.25 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.217 - 0.118 = 0.099$ ，标准曲线

$y_2 = 0.4452x - 0.0008$, 根据标曲得出 $x_2 = 0.224$ ，NADH 含量得：

$\text{NADH}(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 2.24 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.113 - 0.074 = 0.039$ ，标准曲线

$y_1 = 0.5982x + 0.0038$, 根据标曲得出 $x_1 = 0.059$ ，NAD⁺含量得：

$\text{NAD}^+(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div W = 0.59 \text{ nmol/g 质量}$ 。

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 $= A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.120 - 0.097 = 0.023$ ，标准曲线 $y_2 = 0.4452x - 0.0008$, 根据标曲得出

$x_2 = 0.053$ ，NADH 含量得： $\text{NADH}(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 0.53 \text{ nmol/g 质量}$ 。