



辅酶 I NAD (H)含量检测试剂盒（WST 显色法）说明书

微量法

货号: BC5195

规格: 100T/48S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

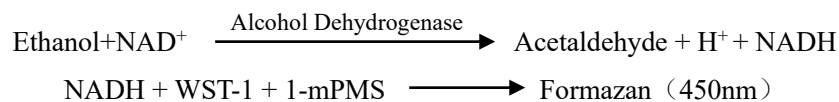
溶液的配制:

- 1、 NAD 标准品: 临用前加入 1.5 mL 蒸馏水, 即 2 μmol/mL。-20°C可以保存 2 周。
- 2、 NADH 标准品: 临用前加入 1.4 mL 蒸馏水, 即 2 μmol/mL。-20°C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，具体比例可以参考文献）

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，10000g 4℃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 0.5 mL 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，10000g 4℃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，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上待测。

NADH 的提取：建议取 0.1 g 组织质量，加入 0.5 mL 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，10000g 4℃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，10000g 4℃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，10000g 4℃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 30 min 以上，调节波长至 450 nm，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 (A ₁ 、A ₁ ')	测定管 (A ₂ 、A ₂ ')	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 ΔA 标准 (y_1 , 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 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： $\text{NAD}^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = x_1 \times (\text{V 提取} + \text{V 血清}) \div \text{V 血清} = 11 \times x_1$
- (2) 按样本蛋白浓度计算 $\text{NAD}^+ (\text{nmol/mg prot}) = x_1 \times \text{V 提取} \div (\text{V 提取} \times \text{Cpr}) = x_1 \div \text{Cpr}$
- (3) 按样本鲜重计算 $\text{NAD}^+ \text{含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \times \text{V 提取} \div \text{W} = x_1 \div \text{W}$
- (4) 按细胞数量计算： $\text{NAD}^+ \text{含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_1 \times \text{V 提取} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADH 含量计算

- (1) 按液体体积计算： $\text{NADH 含量}(\text{nmol/mL}) = x_2 \times (\text{V 提取} + \text{V 血清}) \div \text{V 血清} = 11 \times x_2$
- (2) 按样本蛋白浓度计算 $\text{NADH} (\text{nmol/mg prot}) = x_2 \times \text{V 提取} \div (\text{V 提取} \times \text{Cpr}) = x_2 \div \text{Cpr}$
- (3) 按样本鲜重计算 $\text{NADH 含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \times \text{V 提取} \div \text{W} = x_2 \div \text{W}$
- (4) 按细胞数量计算： $\text{NADH 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_2 \times \text{V 提取} \div 500 = 0.002 \times x_2$

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。

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：**称取约 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.119 - 0.106 = 0.013$ ，标准曲线 $y_1 = 0.373x + 0.0012$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.032$ ，NAD⁺含量得： $\text{NAD}^+ (\text{nmol/g 质量}) = x_1 \div \text{W} = 0.32 \text{ nmol/g 质量}$ 。

NADH 的测定：称取约 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.172 - 0.128 = 0.044$ ，标准曲线 $y_2 = 0.1479x$ ，根据标曲得出 $x_2 = 0.297$ ，NADH 含量得： $\text{NADH} (\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div \text{W} = 2.97 \text{ nmol/g 质量}$ 。

2. **NAD⁺的测定:** 称取约 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: $NAD^+ (nmol/g \text{ 质量}) = x_1 \div W = 3.4 nmol/g \text{ 质量}$ 。

NADH 的测定: 称取约 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: $NADH (nmol/g \text{ 质量}) = x_2 \div W = 2.23 nmol/g \text{ 质量}$ 。

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

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: $NADH (nmol/g \text{ 质量}) = x_2 \div W = 0.47 nmol/g \text{ 质量}$ 。

相关系列产品:

- BC1100/BC1105 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (MTT 显色法)
- BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC0310/BC0315 辅酶 I NAD (H) 含量检测试剂盒 (WST-1 显色法)
- BC5200/BC5205 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (WST-1 显色法)

标准溶液稀释表

NAD⁺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	20
2	20	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

NADH 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