



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：50T/24S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

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 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

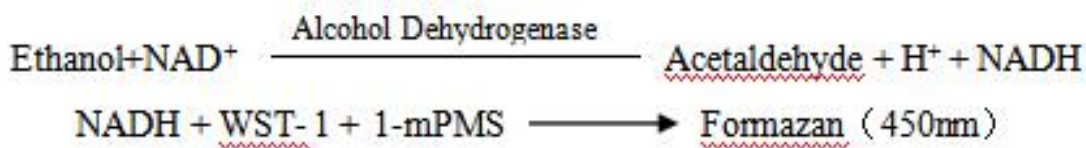
溶液的配制：

- 1、NAD 标准品：临用前加入 1.5mL 蒸馏水，即 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、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°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: $\Delta A_{\text{NAD}}=A_2-A_1$,NADH 的记为 $\Delta A_{\text{NADH}}=A_2'-A_1'$, NAD 标准管的记为 $\Delta A_{\text{AD 标}}=A_{\text{标}}-A_{\text{空白管}}$ 。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: $\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol/mL})=x_1 \times (V_{\text{提取}}+V_{\text{血清}}) \div V_{\text{血清}}=11 \times x_1$

(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: $\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol}/104\text{cell})=x_1 \times V_{\text{提取}} \div 500=0.002 \times x_1$

(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: $\text{NADH 含量}(\text{nmol}/104\text{cell})=x_2 \times V_{\text{提取}} \div 500=0.002 \times x_2$



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 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照} = 0.113 - 0.089 = 0.024$ ，标准曲线 $y_1 = 0.5982x + 0.0038$ ，根据标曲得出 $x_1 = 0.034$ ，NAD⁺含量得：

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

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

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

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

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

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 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照} = 0.217 - 0.118 = 0.099$ ，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 ΔA 测定 = A 测定 - A 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 测定 - A 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： $\text{NADH}(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 0.53 \text{nmol/g 质量}$ 。