

辅酶I NAD(H)含量检测试剂盒使用说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHF2-M96	辅酶I NAD(H)含量检测 试剂盒	96T	微量法

一、测定意义：

NADH 与 NAD⁺是细胞中的一对氧化还原对，NADH 是辅酶I NAD 的还原形式，NAD⁺ 是其氧化形式。在氧化还原反应中，NADH 作为氢和电子的供体，NAD⁺作为氢和电子的受体，参与呼吸作用、光合作用、酒精代谢等生理过程。它们作为生物体内很多氧化还原反应的辅酶参与生命活动，并相互转化。

二、测定原理：

分别用酸性和碱性提取液提取样品中 NAD⁺和 NADH ，NADH 通过递氢体的递氢作用，与显色剂反应生成黄色水溶性甲瓩，在450nm 下检测，得到 NADH 含量。利用乙醇脱氢酶特异性还原NAD⁺为 NADH ，从而检测 NAD⁺含量。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(96T)	保存条件
提取液 A	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液 B	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 1.5mL×1 支	2-8℃保存
试剂二	液体 1.5mL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 1.5mL×1 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

NAD⁺的提取：

1、组织：取 0.1g 组织，加入 1mL 提取液 A，冰浴研磨，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，12000rpm 4℃离

心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 提取液 B 使之中和，混匀，12000rpm 4℃离心 10min ，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）等液体：取 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 提取液 A ，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 提取液 B 使之中和，混匀，12000rpm 4℃离心 10min ，取上清，置冰上待测。

NADH 的提取：

1、组织：取 0.1g 组织，加入 1mL 提取液 B，冰浴研磨，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 提取液 A 使之中和，混匀，12000rpm 4℃离心 10min ，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）等液体：取 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 提取液 B，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，12000rpm 4℃离心 10min；取 500μL 上清液，加入 500μL 提取液 A 使之中和，混匀，12000rpm 4℃离心 10min ，取上清，置冰上待测。

测定步骤

- 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
- 测定前将试剂恢复至室温；
- 样本测定（96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂（μL）	空白管	测定管
上清液	-	20
蒸馏水	20	-
试剂一	15	15
试剂二	15	15
试剂三	150	150
混匀，盖上盖子 37℃避光反应 10min		
试剂四	15	15

混匀，以空白校零，测定 450nm 处初始吸光值 A1 和 15min 时吸光值 A2，计算 $\Delta A/\text{min}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ 。（空白管只需测 1-2 次）。

五、NAD⁺和 NADH 含量的计算：

（一）NAD⁺含量的计算

标准曲线 $y = 0.0372x + 0.0068$; $R^2 = 0.9993$; 其中 y 为 ΔA , x 为 NAD⁺ 浓度 nmol/mL

1. 血清（浆）中 NAD⁺含量计算

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{ 含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A - 0.0068) \div 0.0372 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) \\ &= 537.6 \times (\Delta A - 0.0068) \end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NAD⁺含量计算

（1）按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{ (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0068) \div 0.0372 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \\ &= 26.88 \times (\Delta A - 0.0068) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

（2）按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ \text{ (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0068) \div 0.0372 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 53.76 \times (\Delta A - 0.0068) \div W \end{aligned}$$

（二）NADH 含量的计算

标准曲线 $y = 0.0363x + 0.0019$; $R^2 = 0.9985$; 其中 y 为 ΔA , x 为 NADH 浓度 nmol/mL

1. 血清（浆）中 NADH 含量计算

$$\begin{aligned} \text{NADH 含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A - 0.0054) \div 0.0363 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) \\ &= 550.96 \times (\Delta A - 0.0054) \end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADH 含量计算

（3）按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NADH (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0054) \div 0.0363 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \\ &= 27.55 \times (\Delta A - 0.0054) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

（4）按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{NADH (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0054) \div 0.0363 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 55.1 \times (\Delta A - 0.0054) \div W \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积，0.02mL;

V2: 加入提取液体积，2mL;

V3: 加入血清（浆）体积：0.1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL;

W: 样本质量，g;

六、注意事项：

1、建议正式实验前取 2 个样本做预测定，了解本批样本含量情况，

熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】



【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日