

CheKine™ 辅酶 I NAD(H) 含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1020

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.78 μM-50 μM		灵敏度: 0.78 μM
	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）		
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月		

01 背景与原理

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)是所有细胞中都存在的一种辅酶, 包括 NAD⁺ (氧化型) 和 NADH (还原型) 两种形式。NAD⁺既是氧化还原反应过程中传递电子的辅酶, 又可以作为很多酶的底物来参与细胞内反应。NAD⁺在细胞和体内发挥着重要的功能, 其合成和降解及其产物参与细胞凋亡、代谢调控和基因表达的调控等, 并且 NAD⁺的减少是细胞死亡的主要因素之一。NAD⁺在调节细胞氧化还原状态方面的重要性以及调控信号通路及转录方面的功能, 使得 NAD⁺及其合成和消耗的酶成为多种疾病的潜在药物靶点。

本试剂盒检测原理是 NAD⁺/NADH 检测试剂盒基于酶循环反应 (不识别 NADP⁺/NADPH), 在这一反应过程中 NAD⁺被还原为 NADH, NADH 将 WST-8 还原生成橙黄色 formazan (甲臃), 在 450 nm 左右检测有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中总的 NAD⁺或 NADH 的总量呈正比关系。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Assay Buffer	9 mL	18 mL	4℃
EtOH Solution	1 mL	2 mL	4℃
WST-8	350 μL	700 μL	-20℃, 避光保存
Enhancer	70 μL	140 μL	-20℃, 避光保存
NAD Cycling Enzyme Mix	70 μL	140 μL	-20℃, 避光保存
NAD Standard (10 mM)	100 μL	200 μL	-20℃, 避光保存
NAD Extraction Buffer	6 mL	12 mL	4℃
NADH Extraction Buffer	6 mL	12 mL	4℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	样本稀释用
其他	匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

注意：各组分开盖前，请先低速离心。

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
EtOH Solution	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
WST-8	即用型；	实验过程中避光冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存，禁止反复冻融
Enhancer	即用型；	实验过程中避光冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存，禁止反复冻融
NAD Cycling Enzyme Mix	即用型；	实验过程中避光冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存，禁止反复冻融
NAD Standard (10 mM)	即用型；	实验过程中避光冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
NAD Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
NADH Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存

05-1-2 标准品配制

取 5 μL 10 mM 的 NAD 用 995 μL Assay Buffer 稀释至 1 mL 50 μM NAD 预混物。按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品 (μL)	Assay Buffer (μL)	浓度 (μM)
1	400 μL 50 μM NAD	0	50
2	200 μL of 50 μM	200	25
3	200 μL of 25 μM	200	12.5
4	200 μL of 12.5 μM	200	6.25
5	200 μL of 6.25 μM	200	3.13
6	200 μL of 3.13 μM	200	1.56
7	200 μL of 1.56 μM	200	0.78
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不能马上进行该项实验，建议将样本储存在 -80°C ，可储存一个月。当准备好进行该项实验时，将样本从 -80°C 拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **组织样本的提取方法：**冰上预冷的 PBS 洗涤组织后，称取约 20 mg 的组织样品，用剪刀剪碎，置于匀浆器中。

提取 NAD：加入 100 μL NAD Extraction Buffer 匀浆样本。煮沸 5 min (盖紧，以防止水分散失) 后加入 20 μL Assay Buffer 和 100 μL NADH Extraction Buffer 中和提取物。 4°C ，14000 rpm 离心 5 min，将上清转移到新离心管，冰上待测。

提取 NADH：加入 100 μL NADH Extraction Buffer 匀浆样本。煮沸 5 min (盖紧，以防止水分散失) 后加入 20 μL Assay Buffer 和 100 μL NAD Extraction Buffer 中和提取物。 4°C ，14000 rpm 离心 5 min。将上清转移到新离心管，冰上待测。

- **细胞或细菌样本的提取方法：**收集细胞或细菌样本（样本量建议为 1×10^6 个/次），用冷 PBS 清洗细胞或细菌，低速离心 5 min，弃上清液。

提取 NAD：加入 100 μL NAD Extraction Buffer，超声波破碎 5 min（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），煮沸 5 min (盖紧，以防止水分散失) 后加入 20 μL Assay Buffer 和 100 μL NADH Extraction Buffer 中和提取物。 4°C ，14000 rpm 离心 5 min，将上清转移到新离心管，冰上待测。

提取 NADH：加入 100 μL NADH Extraction Buffer，超声波破碎 5 min（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），煮沸 5 min (盖紧，以防止水分散失) 后加入 20 μL Assay Buffer 和 100 μL NAD Extraction Buffer 中和提取物。 4°C ，14000 rpm 离心 5 min，将上清转移到新离心管，冰上待测。

- **血清（浆）样本的提取方法：**

提取 NAD：吸取约 20 μL 的血清（浆），加入 100 μL NAD Extraction Buffer，煮沸 5 min (盖紧，以防止水分散失) 后加入 20 μL Assay Buffer 和 100 μL NADH Extraction Buffer 中和提取物。 4°C ，14000 rpm 离心 5 min，将上清转移到新离心管，冰上待测。

提取 NADH：吸取约 20 μL 的血清（浆），加入 100 μL NADH Extraction Buffer，煮沸 5 min (盖紧，以防止水分散失) 后加入 20 μL Assay Buffer 和 100 μL NAD Extraction Buffer 中和提取物。 4°C ，14000 rpm 离心 5 min。

将上清转移到新离心管，冰上待测。

05-3 实验步骤

注意：工作液的加入需要迅速，各组分需要彻底混合。建议使用多通道移液器；为避免干扰实验，样本中应避免有如下物质存在：EDTA (>0.5 mM), ascorbic acid, SDS (>0.2%), sodium azide, NP-40 (>1%)及 Tween-20 (>1%)。

- 1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。
- 2. 工作液的配制：临用前配制，对于 96 孔板，按照每孔配制 85 μ L 工作液，现配现用。吸取 68 μ L Assay Buffer, 1 μ L NAD Cycling Enzyme Mix, 5 μ L WST-8, 1 μ L Enhancer 混合后，室温孵育 5 min，再加入 10 μ L EtOH Solution。
- 3. 检测体系配制：在 96 孔板中按照如下方式操作

试剂	空白孔 (μ L)	标准孔 (μ L)	测定孔 (μ L)
Assay Buffer	40	0	0
不同浓度的 Standard	0	40	0
样本	0	0	40
工作液	80	80	80

- 4. 吸光度检测：充分混匀，室温孵育 30 min，测定 450 nm 处的吸光值，分别标记为 $A_{空}$ 、 $A_{标}$ 和 $A_{测}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{测}=A_{测}-A_{空}$ ， $\Delta A_{标}=A_{标}-A_{空}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值 (μ M) 。

3. 样本 NAD 或 NADH 含量计算

- 按样本质量计算：

$$\text{NAD 或 NADH (nmol/g 鲜重)} = (y \times V_{样}) \div (W \times V_{样} \div V_{提取}) \times n = 0.22 \times y \div W \times n$$

- 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{NAD 或 NADH (nmol/mg prot)} = (y \times V_{样}) \div (V_{样} \times Cpr) \times n = y \div Cpr \times n$$

- 按细胞或细菌数量计算：

$$\text{NAD 或 NADH (nmol/10}^4\text{)} = (y \times V_{样}) \div (N \times V_{样} \div V_{提取}) \times n = 0.22 \times y \div N \times n$$

- 按血清（浆）计算：

$$\text{NAD 或 NADH (nmol/mL)} = y \times (V_{提取} + V_{液样}) \div V_{液样} \times n = 12 \times y \times n$$

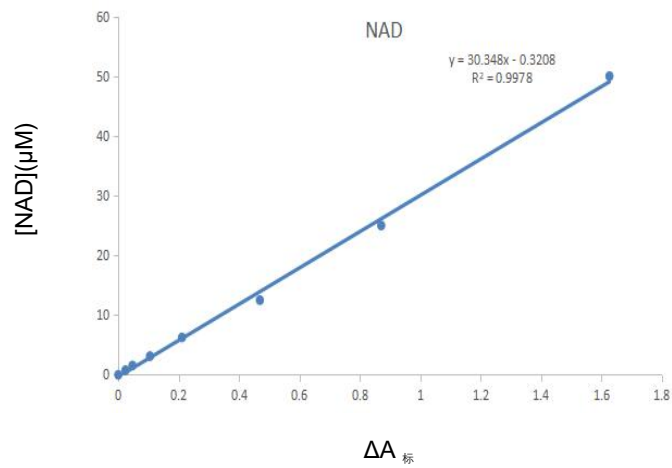
nmol: 1 μ M=1 nmol/mL; $V_{样}$: 加入样本体积, 0.04 mL; $V_{提取}$: 提取液总体积, 0.22 mL; $V_{液样}$: 血清（浆）的体积, 0.02 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞或细菌数量, 以 10^4 为单位（例

如细胞数量为 1×10^6 , N=100) ; n: 稀释倍数。

07 结果展示

典型标准曲线： $y=30.348x-0.3208$, $R^2=0.9978$

注意：在这些浓度下，NAD 和 NADH 的标准曲线是相同的。此说明书中，我们仅提供 NAD 标准曲线。



示例-1: 取 0.02 g 小鼠肝, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测}}=A_{\text{测}}-A_{\text{空}}=0.2646-0.131=0.1336$, 代入标准曲线, 计算 $y=3.734$ 。按样本质量计算得: NAD 或 NADH (nmol/g 鲜重)= $0.22 \times y \div W \times n=41.07$ nmol/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测}}$ 过高或者过低怎么办?

如果样本的 $\Delta A_{\text{测}}$ 高于 50 μM 标准品的 $\Delta A_{\text{标}}$ 值, 将样本用去离子水进行稀释后, 再进行实验, 结果乘以稀释倍数。
如果样本 $\Delta A_{\text{测}}$ 低于 0.01, 可适当增加样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1010	CheKine™ 辅酶 II NADP(H) 含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1021	CheKine™ NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1022	CheKine™ NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ 辅酶 I NAD(H) 含量检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1020)

