

辅酶1 NAD(H)含量 (WST-8法)检测试剂盒说明书

规格：微量法 48样

检测波长：450nm

编号：JLC_K14813

检测原理：WST-8法

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

辅酶 I NAD(H)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，NAD⁺是糖酵解（EMP）和三羧酸循环（TCA）的主要氢受体，生成的NADH经呼吸电子链（ETC）传递把电子交给氧，在合成ATP的同时，形成大量的ROS，同时NADH再生为NAD⁺。糖、脂、蛋白质三大代谢物质分解中的氧化反应绝大部分通过这一体系完成。NAD(H)含量和NADH/NAD⁺比值的高低可用于评价糖酵解和TCA循环的强弱。较高的NAD(H)及NADH/NAD⁺比值说明细胞呼吸耗氧量较高，处于过氧化状态。此外，NADH/NAD⁺比值升高也可抑制糖酵解和TCA循环。另外，NAD⁺降解产物对细胞信号传导、代谢和基因表达等具有重要的调控作用。

测定原理

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-8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-8检测。

需自备的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、移液器、水浴锅、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制

酸性提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

碱性提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

NADH提取液：液体60mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体10 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存，用时加入0.7mL NADH提取液混匀，分装冻存避免反复冻融；

试剂三：液体1.2mL×1瓶，-20℃保存；

标准品A：粉剂×1支，-20℃保存。

标准品B：粉剂×1支，-20℃保存。

NAD⁺和NADH的提取

1、血清（浆）中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：按照血清（浆）体积（mL）：酸性提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.1mL血清（浆），加入1mL酸性提取液），95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

NADH的提取：按照血清（浆）体积（mL）：NADH提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.05mL血清（浆），加入1mLNADH提取液），充分震荡，60℃水浴30min（盖紧，以防止水分散失）；10000g 4℃离心10min；取上清，置冰上待测。

2、组织中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：按照组织质量（g）：酸性提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.1g组织，加入1mL酸性提取液），冰浴研磨，95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

NADH的提取：按照组织质量（g）：NADH提取液体积（mL）为1：5~20的比例（建议取约0.05g组织，加入1mLNADH提取液），冰浴研磨，60℃水浴30min（盖紧，以防止水分散失）；10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

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，弃上清，按照细菌或细胞数量（10⁴个）：酸性提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL酸性提取液），超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次），95℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min；取500μL上清液，加入500μL碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、NADH的提取：先收集细胞或细菌到离心管内，弃上清，按照细菌或细胞数量（10⁴个）：NADH提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mLNADH提取液），超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次），60℃水浴30min（盖紧，以防止水分散失）；12000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、酶标仪预热30min以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零。

2、加样表(在96孔板中按下表依次加样)：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	160	160
试剂二	10	10
试剂三	10	10

充分混匀，37°C孵育30min后于450nm处测定吸光值A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

注意事项

- 1、反应过程中注意避光。
- 2、若 ΔA 过小可增加样本量或延长反应时间，公式中的W或V应相应改变。

NAD⁺含量的计算

以标准品浓度 (nmol/mL) 为横坐标 (x)，以其对应的 标准管 ΔA (A标准管- A空白管) 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，即可得到线性方程 $y=ax+b$

1、血清 (浆) 中NAD⁺含量计算：

$$\text{NAD}^+\text{含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - b) \div a \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 20 \div a \times (\Delta A - b)$$

2、组织、细菌或细胞中NAD⁺含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NAD}^+(\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A - b) \div a \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = (\Delta A - b) \div a \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NAD}^+(\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A - b) \div a \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 2 \times (\Delta A - b) \div a \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NAD}^+(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - b) \div a \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.004 \times (\Delta A - b)$$

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; 500: 细胞或细菌总数, 500万。

NADH含量的计算：

$$\text{NADH含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - d) \div c \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 20 \div c \times (\Delta A - d)$$

1、血清 (浆) 中NADH含量计算

$$\text{NADPH含量}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A - 0.0378) \div 0.4207 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 47.54 \times (\Delta A - 0.0378)$$

2、组织、细菌或细胞中NADH含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADH (nmol/mg prot)} = [(\Delta A - d) \div c \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = (\Delta A - d) \div c \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADH (nmol/104 cell)} = [(\Delta A - d) \div c \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.002 \times (\Delta A - d)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2: 加入提取液体积, 1mL;
V3: 加入血清(浆)体积: 0.05mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;
W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万。

附：标准曲线制作过程

- 1、备NAD标准品母液 (1umol/mL): 在标准品管A中加入1.5mL水得1umol/mL NAD。
- 2、制备NADH标准品母液 (1umol/mL): 在标准品管B中加入1.41mL水得1umol/mL NADH。
- 3、把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.5, 1, 1.5, 2nmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 4、依据以下测定步骤操作, 根据结果绘制标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	空白管
标准品	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	160	160
试剂二	10	10
试剂三	10	10

充分混匀, 37°C孵育30min后于450nm处测定吸光值A, 计算 $\Delta A = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

以标准品浓度 (nmol/mL) 为横坐标 (x), 以其对应的吸光值差值 (ΔA) 为纵坐标 (y), 绘制拟合曲线, 替代结果计算中的标准曲线方程;

NAD标准曲线记为 $y = ax + b$

NADH标准曲线记为 $y = cx + d$

NAD和NADH不稳定, 建议配置成溶液后尽快使用, 不要长期保存。

预实验的意义**比色法检测试剂盒预实验非常重要**

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过3 - 5组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。