

辅酶 I NAD(H)含量(WST-8 法)

规格：微量法 48 样

检测波长：450nm

编号：ml300801

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。

试剂的组成和配制：

酸性提取液：液体 50mL×1 瓶，4°C 保存；

碱性提取液：液体 50mL×1 瓶，4°C 保存；

NADH 提取液：液体 60mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂一：液体 10 mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20 °C 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°C 保存；

标准品 A：粉剂×1 支，-20°C 保存。

标准品 B：粉剂×1 支，-20°C 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°C水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C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°C水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失); 10000g 4 °C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°C水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C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°C水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失); 10000g 4 °C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 (10^4 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°C水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000g 4 °C离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 500μL 碱性提取液使之中和, 混匀, 10000g 4 °C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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 (10^4 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°C水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失); 12000g 4 °C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

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

2、组织、细菌或细胞中 NAD⁺含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

V3: 加入血清 (浆) 体积: 0.1mL;

W: 样本质量, g;

V2: 加入提取液体积, 2mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

500: 细胞或细菌总数, 500 万。

NADH 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 $y=cx+d$

1、血清 (浆) 中 NADH 含量计算

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

2、组织、细菌或细胞中 NADH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

(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

$$\begin{aligned}\text{NADH (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A-d) \div c \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.002 \times (\Delta A - d)\end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL;
V3: 加入血清 (浆) 体积: 0.05mL;
W: 样本质量, g;

V2: 加入提取液体积, 1mL;
Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;
500: 细胞或细菌总数, 500 万。

附：标准曲线制作过程

- 1、制备 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。