

辅酶 I NAD (H)含量检测试剂盒 (WST 显色法) 说明书

可见分光光度法

货号: BC5190

规格: 50T/24S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|----------|--------------|---------|
| 酸性提取液 | 液体 15 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 碱性提取液 | 液体 15 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂一 | 液体 20 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二 | 液体 6 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂三 | 液体 12mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂四 | 液体 3mL×1 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂五 | 液体 40 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| NAD 标准品 | 粉剂×1 支 | -20°C保存 |
| NADH 标准品 | 粉剂×1 支 | -20°C保存 |

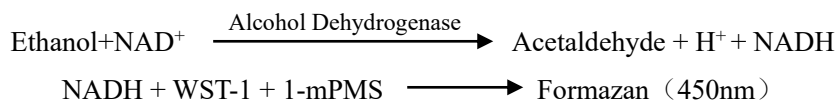
溶液的配制:

- 1、 NAD 标准品: 临用前加入 1.5 mL 蒸馏水, 即 2 μmol/mL。-20°C可以保存 2 周。
- 2、 NADH 标准品: 临用前加入 1.4 mL 蒸馏水, 即 2 μmol/mL。-20°C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，具体比例可以参考文献）

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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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 0.5 mL 碱性提取液，煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失）；冰浴冷却后，10000g，4℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上待测。

NADH 的提取：建议取 0.1 g 组织质量，加入 0.5 mL 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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 碱性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃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℃离心 10min；取 200μL 上清液，加入 200μL 酸性提取液使之中和；混匀，10000g 4℃离心 10min，取上清，冰上待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm，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 (A ₁ 、A ₁ ') | 测定管 (A ₂ 、A ₂ ') | 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： $\Delta A_{NAD} = A_2 - A_1$ ，NADH 的记为 $\Delta A_{NADH} = A_2' - A_1'$ ，NAD 标准管的记为 $\Delta A_{NAD 标} = A_{标} - A_{空白管}$ 。NADH 标准管的记为 $\Delta A_{NADH 标} = A_{标}' - A_{空白管}$ 。（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： $NAD^+ \text{含量}(\text{nmol/mL}) = x_1 \times (V_{提取} + V_{血清}) \div V_{血清} = 11 \times x_1$

(2) 按样本蛋白浓度计算 $NAD^+ (\text{nmol/mg prot}) = x_1 \times V_{提取} \div (V_{提取} \times Cpr) = x_1 \div Cpr$

(3) 按样本鲜重计算 $NAD^+ \text{含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_1 \times V_{提取} \div W = x_1 \div W$

(4) 按细胞数量计算： $NAD^+ \text{含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_1 \times V_{提取} \div 500 = 0.002 \times x_1$

(二) NADH 含量计算

(1) 按液体体积计算： $NADH \text{含量}(\text{nmol/mL}) = x_2 \times (V_{提取} + V_{血清}) \div V_{血清} = 11 \times x_2$

(2) 按样本蛋白浓度计算 $NADH (\text{nmol/mg prot}) = x_2 \times V_{提取} \div (V_{提取} \times Cpr) = x_2 \div Cpr$

(3) 按样本鲜重计算 $NADH \text{含量}(\text{nmol/g 质量}) = x_2 \times V_{提取} \div W = x_2 \div W$

(4) 按细胞数量计算： $NADH \text{含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = x_2 \times V_{提取} \div 500 = 0.002 \times x_2$

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。

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 ΔA 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:

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

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 ΔA 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:

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

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 ΔA 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:

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

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 ΔA 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:

$$\text{NADH} (\text{nmol/g 质量}) = x_2 \div W = 0.53 \text{ nmol/g 质量}。$$

相关系列产品:

- BC1100/BC1105 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (MTT 显色法)
- BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC0310/BC0315 辅酶 I NAD (H) 含量检测试剂盒 (WST 显色法)
- BC5200/BC5205 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒 (WST 显色法)