

## NAD<sup>+</sup>/NADH Assay Kit

### NAD<sup>+</sup>/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)

产品编号	产品名称	规格
BL1431A	NAD <sup>+</sup> /NADH 检测试剂盒(WST-8 法)	100T

#### 产品简介:

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<sup>+</sup>(氧化型)和 NADH(还原型)两种形式。NAD<sup>+</sup>在细胞和体内发挥着重要的功能, 参与细胞凋亡、代谢调控和基因表达的调控等, 并且 NAD<sup>+</sup>的减少是细胞死亡的主要因素之一。传统的 NAD<sup>+</sup>/NADH 以及 NADP<sup>+</sup>/NADPH 测定是通过检测 340nm 处的吸收来完成的, 该方法灵敏度低且易受干扰。本产品基于 WST-8 的显色反应, 通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中 NAD<sup>+</sup>(氧化型辅酶I)和 NADH(还原型辅酶I)各自的量、比值和总量的检测试剂盒。NAD/NADH 检测试剂盒能特异性地检测 NAD<sup>+</sup>和 NADH, 而不检测 NADP<sup>+</sup>和 NADPH, 在反应过程中 NAD<sup>+</sup>被还原为 NADH, NADH 将 WST-8 还原成橙黄色 formazan (甲贲), 在 450 nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中 NAD<sup>+</sup>或 NADH 的总量呈比例关系。

#### 产品组成:

编号	试剂名称	规格
BL1431A-1	乙醇脱氢酶	220μL
BL1431A-2	显色液	1.1mL
BL1431A-3	NADH	5mg
BL1431A-4	NADH 配制液	0.8mL
BL1431A-5	NAD <sup>+</sup> /NADH 提取液	60mL
BL1431A-6	反应缓冲液	10mL

#### 使用方法:

##### 1. 样品的准备:

- 细胞样品的准备: 对于贴壁细胞, 约  $1 \times 10^6$  个细胞(大约相当于 6 孔板一个孔长满的细胞数量), 吸净培养液, 用移液器加入 200μL 预冷的 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液, 并轻轻吹打, 以促进细胞的裂解; 对于悬浮细胞, 约  $1 \times 10^6$  个细胞, 600g 离心 5 分钟, 吸净培养液, 用移液器加入 200μL 预冷的 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液, 并轻轻吹打, 以促进细胞的裂解; 裂解过程在室温或冰上操作均可。随后 12,000g, 4°C 离心 5-10 分钟, 取上清作为待测样品备用。
- 组织样品的准备: 冰上预冷的 PBS 洗涤组织后, 称取约 10-30mg 的组织样品, 用剪刀剪碎, 置于匀浆器中, 加入 400μL 的 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液在室温或冰上进行匀浆。随后 12,000g, 4°C 离心 5-10 分钟, 取上清作为待测样品备用。

##### 2. 试剂盒的准备工作:

- NADH 标准品的配制: 吸取 655μL NADH 配制液, 充分溶解本试剂盒提供的 5mg NADH 后即得到 10mM NADH 标准品。10mM NADH 标准品请适当分装后-80°C 避光保存。
- NADH 标准曲线的设置: 将 10mM 的 NADH 标准品用 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液稀释成适当的浓度梯度, 如初次检测可以设置 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10μM 这几个浓度, 检测时 96 孔板中每孔加入 20μL 的标准品, 相当于每孔为 0、5、10、20、40、80、120、160、200pmol 的 NADH。如有必要, 在后续的实验中可以根据样品中的 NADH 含量对标准品的

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



浓度范围进行适当调整。其中浓度为 0 $\mu$ M 的点为空白对照点，仅含 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液。  
注意：由于 NADH 很不稳定，故配制后需尽快使用。

- (c) 乙醇脱氢酶工作液的配制：将乙醇脱氢酶用反应缓冲液稀释 45 倍，例如 2 $\mu$ L 乙醇脱氢酶加入到 88 $\mu$ L 的反应缓冲液中，即可获得 90 $\mu$ L 的乙醇脱氢酶工作液。每个标准品或样品的检测需要使用 90 $\mu$ L 的乙醇脱氢酶工作液，请根据所需检测的标准品和样品的数量，配制适量的乙醇脱氢酶工作液，并注意现配现用。

### 3. 样品测定：

- (a) 样品中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量的测定：吸取 20 $\mu$ L 待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量过高，超出标准曲线的范围，则需要用 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；总量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。
- (b) 样品中 NAD<sup>+</sup>、NADH 的含量或者 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值的测定：吸取 50-100 $\mu$ L 待测样品于离心管中，60 $^{\circ}$ C 水浴或 PCR 仪上加热 30 分钟以分解 NAD<sup>+</sup>。如果加热后产生不溶物，则需 10,000g，室温或 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟，吸取 20 $\mu$ L 上清液作为待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NAD<sup>+</sup>或 NADH 的含量过高，超出标准曲线的范围，则需要用 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；含量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。
- (c) 请参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、标准品孔和样品孔。加入乙醇脱氢酶工作液后充分混匀。

	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
待测样品	—	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
NAD <sup>+</sup> /NADH 提取液	20 $\mu$ L	—	—
乙醇脱氢酶工作液	90 $\mu$ L	90 $\mu$ L	90 $\mu$ L

- (d) 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟。说明：此孵育步骤的目的是将样品中的 NAD<sup>+</sup>转化为 NADH；在加入乙醇脱氢酶工作液的过程中须轻柔操作，以免产生气泡。若不慎出现气泡，可使用细小的吸头或针头戳破。
- (e) 适当混匀显色液，然后每孔加入 10 $\mu$ L 显色液，混匀，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟，此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm 处的吸光度。如果显色较浅，也可以适当延长孵育时间至 45-60 分钟。

### 4. 结果结算

- (a) 计算标准品组中每个点的平均吸光度，减去空白对照组的吸光度，即为各个标准品的吸光度。
- (b) 以 NADH 的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。NADH 标准品的检测结果请参考图 1。

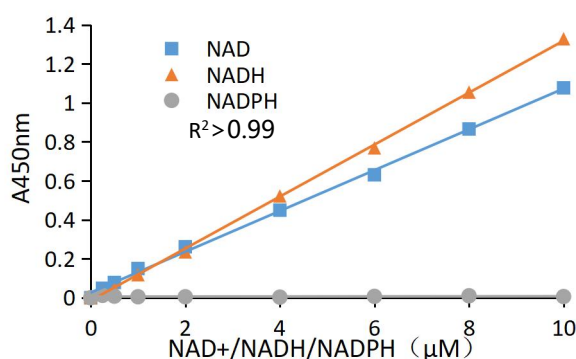


图 1. NAD<sup>+</sup>和 NADH 的标准曲线。上图显示本试剂盒可以很好地检测出 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的含量，并且不会受 NADPH 的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



(c) 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总浓度或者 NADH 的浓度。未 60°C 加热处理时，检测得到的是样品中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总量的浓度(NAD<sub>total</sub>)；60°C 加热处理后，检测得到的是样品中 NADH 的浓度。

备注：根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出 NAD<sup>+</sup>、NADH、NAD<sub>total</sub> 的量。

(d) 根据如下计算公式，计算样品中 NAD<sup>+</sup>的量以及 NAD<sup>+</sup>/NADH 的比值。此时可以把 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总量或各自的含量用单位细胞数量或单位组织重量中的含量来表示。

$$[\text{NAD}^+] = [\text{NAD}_{\text{total}}] - [\text{NADH}]$$

$$[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = ([\text{NAD}_{\text{total}}] - [\text{NADH}])/[\text{NADH}]$$

(e) 如果希望更加精确地来表述 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总量或各自的含量，可以将样品用 BCA 法测定蛋白浓度。最终用单位蛋白量中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总量或各自的含量来比较精确地进行表述。

### 注意事项：

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 有效期：

-20°C 保存 1 年。显色液(BL1431A-2)和 NADH (BL1431A-3)须-20°C 避光保存。NADH 配制成溶液后，须适当分装后-80°C 保存。所有试剂避免反复冻融。

