

NAD⁺/NADH检测试剂盒(WST-8法)

产品货号: BA3497

产品规格: 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⁺(氧化型)和NADH(还原型)两种形式。NAD⁺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⁺的减少是细胞死亡的主要因素之一。传统的NAD⁺/NADH以及NADP⁺/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⁺(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⁺和NADH, 而不检测NADP⁺和NADPH, 在反应过程中NAD⁺被还原为NADH, NADH将WST-8还原成橙黄色formazan(甲臌), 在450nm左右有最大吸收峰。反应体系中生成的formazan与样品中NAD⁺或NADH的总量呈比例关系。

本产品仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

试剂名称	100T	保存条件
乙醇脱氢酶	220μL	-20℃
显色液	1.1mL	-20℃, 避光
NADH	5mg	-20℃, 避光
NADH配制液	0.8mL	2-8℃
NAD ⁺ /NADH提取液	60mL	2-8℃
反应缓冲液	10mL	2-8℃

【注】: 粉剂量在mg级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

操作步骤(仅供参考):

建议正式实验前, 选取2个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

一、样品的准备:

1. 细胞样品的准备: 对于贴壁细胞, 约 1×10^6 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⁺/NADH提取液, 并轻轻吹打, 以促进细胞的裂解; 对于悬浮细胞, 约 1×10^6 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⁺/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℃离心5-10分钟, 取上清作为待测样品备用。
2. 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⁺/NADH提取液在室温或冰上进行匀浆。随后12,000g, 4℃离心5-10分钟, 取上清作为待测样品备用。

二、试剂盒的准备工作:

1. NADH标准品的配制: 吸取655μLNADH配制液, 充分溶解5mg NADH后即得到10mM NADH标准品。
注意: 10mM NADH标准品请适当分装后-80℃避光保存。
2. NADH标准曲线的设置: 将10mM的NADH标准品用NAD⁺/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, 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, 在后续的实验可以根据样品中的NADH含量对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为0μM的点为空白对照点, 仅含NAD⁺/NADH提取液。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

注意：由于NADH很不稳定，故配制后的NADH标准梯度需尽快使用。

- 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 μ L乙醇脱氢酶加入到88 μ L的反应缓冲液中，即可获得90 μ 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 μ 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。

三、样品测定：

- 酶标仪预热30min以上，调节波长至450nm。
- 样品中NAD⁺和NADH的总量的测定：吸取20 μ 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⁺和NADH的总量过高，超出标准曲线的范围，则需要用NAD⁺/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。
- 样品中NAD⁺、NADH的含量或者NAD⁺/NADH比值的测定：吸取50-100 μ 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⁺。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 μ 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⁺或NADH的含量过高，超出标准曲线的范围，则需要用NAD⁺/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。
- 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 μ L	20 μ L
NAD ⁺ /NADH提取液	20 μ L	-	-
乙醇脱氢酶工作液	90 μ L	90 μ L	90 μ L

- 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⁺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。

- 适当混匀显色液，然后每孔加入10 μ 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。

结果计算：

- 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。
- 以NADH的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。NADH标准品的检测效果请参考图1。

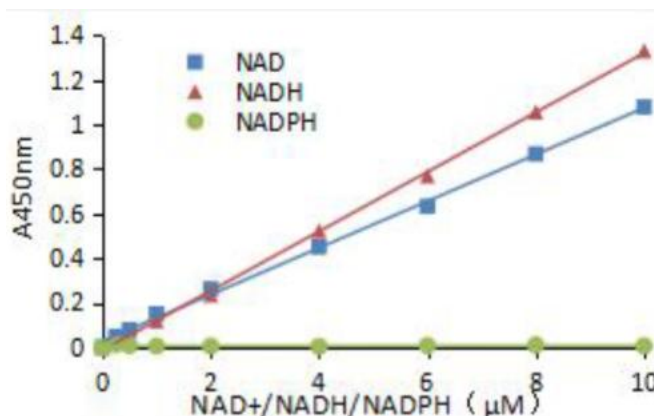


图1.NAD⁺和NADH的标准曲线

上图显示本试剂盒可以很好地检测出NAD⁺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。

- 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的NAD⁺和NADH总浓度或者NADH的浓度。未60 $^{\circ}$ C加热处理时，检测得到的



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

是样品中NAD⁺和NADH总量的浓度(NAD total); 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⁺、NADH、NAD total的量。

4. 根据如下计算公式, 计算样品中NAD⁺的量以及NAD⁺/NADH的比值。此时可以把NAD⁺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。

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

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

5. 如果希望更加精确地来表述NAD⁺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⁺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。
3. 试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。

有效期:

低温运输, -20°C保存, 12个月有效。

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>