

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(甲臜),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:

- 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。
- 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:

- NADH 标准品的配制: 吸取 655μL NADH 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。
- 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,在后续的实验中可以根据样品中的 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。

注意: 由于 NADH 很不稳定,故配制后的 NADH 标准梯度需尽快使用。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

- 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，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。

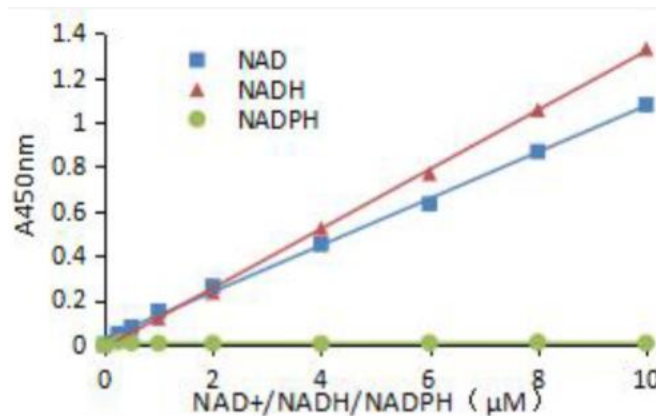


图1.NAD⁺和NADH的标准曲线

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，检测得到的是样品中 NAD⁺和 NADH 总量的浓度(NAD total)；60 $^{\circ}$ 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com