

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01192

产品介绍

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⁺ 既是氧化还原反应过程中传递电子的辅酶, 又可以作为很多酶的底物来参与细胞内反应。NAD⁺ 在细胞和体内发挥着重要的功能, 其合成和降解及其产物参与细胞凋亡、代谢调控和基因表达的调控等, NAD⁺ 的减少是细胞死亡的主要因素之一。NAD⁺ 在调节细胞氧化还原状态方面的重要性以及调控信号通路及转录方面的功能, 使得 NAD⁺ 及其合成和消耗的酶成为多种疾病的潜在药物靶点。传统的 NAD⁺/NADH 和 NADP⁺/NADPH 测定是通过检测 340 nm 处的吸收来完成的, 该方法灵敏度低且易受干扰。NAD/NADH 检测试剂盒是一种基于 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 (甲臃), 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⁺ 或 NADH 的总量成比例关系。本试剂盒可检测 0.1~10 μ M NAD⁺ 或 NADH。检测原理见图 1:

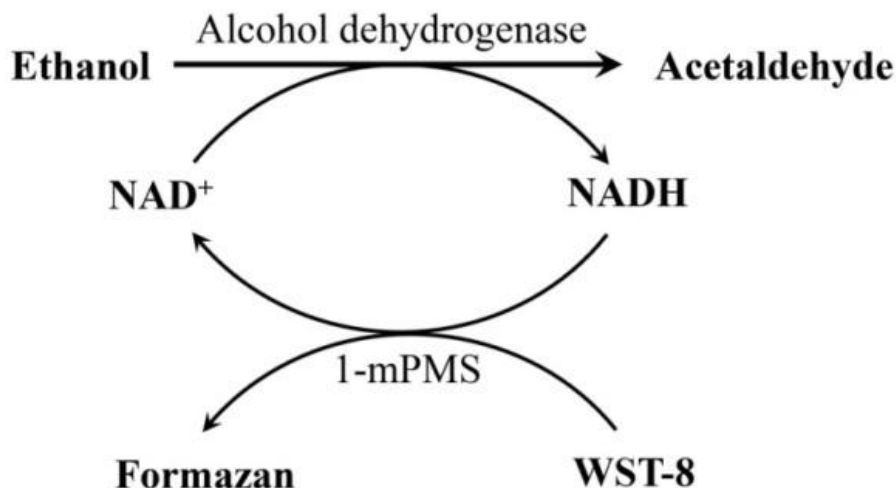


图 1 检测原理图

应用范围

NAD/NADH 检测、细胞分解代谢指标检测

储运条件

-20 °C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

特异性好: 本试剂盒只检测 NAD/NADH, 不检测 NADP/NADPH;

溶解度高: Formazan 产物的溶解度相较于 WST-1、MTT、XTT 的产物溶解度更高;

灵敏度高: WST-8 相较于 WST-1 灵敏度更高, 可检测低至 0.1 μ M 浓度 NAD⁺ 或者 NADH;

线性度好: 0.25~10 μ M NADH 保持良好的线性关系。

注意事项

- 1.建议 NADH 标准品溶解后小量分装保存, 避免反复冻融。
- 2.NAD⁺/NADH 提取液粘稠, 使用过程中务必保证和待加入的体系充分混匀。
- 3.加样和混匀过程中, 应避免产生气泡影响最终的吸光度检测。
- 4.由于 NAD⁺/NADH 不稳定, 易降解, 所以尽量使用新鲜样品进行检测。
- 5.本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品和药品, 不得存放于普通住宅内。
- 6.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材
(1) 离心管 (2) 96 孔板
- 2.试剂
(1) 预冷 PBS (2) ddH₂O
- 3.仪器
(1) 酶标仪 (测吸光度) (2) 匀浆仪 (可选) (3) 离心机

操作步骤

1.样品准备

细胞样品 (贴壁细胞或悬浮细胞): 收集约 1×10^6 个细胞, 离心去除培养液, 用预冷的 PBS 清洗细胞, 离心 5 min, 弃上清, 加入 200 μ L 冰浴预冷的 NAD⁺/NADH 提取液, 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。裂解结束后 12,000 g, 4 °C 离心 5~10 min, 取上清备用。

组织样品: 冰上预冷的 PBS 清洗组织后, 称取样品 10~30 mg, 用剪刀剪碎, 置于匀浆器中, 加入 400 μ L NAD⁺/NADH 提取液于室温下或冰上进行匀浆, 结束后 12,000 g, 4 °C 离心 5~10 min, 取上清备用。

2.实验准备

(1) 配制 10 mM NADH 标品: 10 $\times$ NADH 配制液先用水稀释为 1 $\times$ 的 NADH 配制液, 再吸取 141.0 μ L (20 T) / 704.8 μ L (100 T) 1 $\times$ NADH 配制液加入 D 组分所在的管中, 充分溶解, 得到 10 mM NADH 标品溶液, 适当分装后置于 -80 °C 冰箱, 避光保存。

(2) 稀释标品: 将 10 mM 的 NADH 标品用 NADH 配制液稀释成合适的浓度梯度, 如 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10 μ M, 向 96 孔板中每孔加入 20 μ L 的标准品。如有需要, 可根据样品中 NADH 的含量适当调整标品浓度范围。

(3) 乙醇脱氢酶工作液的配制 (现用现配): 用反应缓冲液将乙醇脱氢酶稀释 45 倍。检测时, 向每个标品或样品中加入 90 μ L 乙醇脱氢酶工作液。

3.样品测定

(1) NAD⁺/NADH 总量测定: 吸取 20 μ L 待测样品于 96 孔板中, 设置重复。如样品中的 NAD⁺ 或 NADH 含量过高, 超出标准曲线的范围, 则需用 NADH 配制液适当稀释后再进行检测, 含量过低时应增加样品的用量。

(2) 样品中 NAD⁺、NADH 含量或 NAD⁺/NADH 比值的测定: 向离心管中加入 50~100 μ L 待测样品, 60 °C 加热 30 min 以分解 NAD⁺, 如果加热后产生不溶物, 10000 g, 室温或 4 °C 离心 5 min, 吸取 20 μ L 上清至 96 孔板中待测, 设置重复。如样品中的 NAD⁺ 或 NADH 含量过高, 超出标准曲线的范围, 则需用 NADH 配制液适当稀释后再进行检测, 含量过低时应增加样品的用量。

(3) 在 96 孔板中按照如下方式加样, 设置空白对照、标准品和样本组, 加入乙醇脱氢酶工作液后充分混匀 (加入乙醇脱氢酶工作液过程请轻柔操作, 以免产生气泡; 若不慎产生气泡, 可用枪头戳破)。

	空白对照	标准品	样品
待测样品	-	20 μ L	20 μ L
NADH 配制液	20 μ L	-	-
乙醇脱氢酶工作液	90 μ L	90 μ L	90 μ L

(4) 每孔加入 10 μ L 显色液, 充分混匀后, 室温孵育 30 min, 测 450 nm 处的吸光度。

注: 该操作是将样品中的 NAD⁺ 通过乙醇脱氢酶作用转化成 NADH, WST-8 与 NADH 在电子耦合剂的作用下反应生成水溶性甲臃产物。

(5) 数据分析

根据标准曲线计算样品中的 NAD⁺ 和 NADH 总浓度或 NADH 的浓度, 通过样品加入的体积和稀释倍数即可计算出 NAD⁺、NADH、NAD⁺/NADH 总量以及计算出 NAD⁺/NADH 的比值 (Ratio)。相关计算公式如下:

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

$$\text{Ratio}[\text{NAD}^+/\text{NADH}] = [\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$$