

改良型 NAD⁺/NADH 含量检测试剂盒 (WST-8 法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0703	改良型 NAD ⁺ /NADH 含量检测试剂盒 (WST-8 法)	100T

产品内容

名称	规格	储存条件
NAD ⁺ /NADH 提取液	50mL	-20℃, 避光; 避免反复冻融。
NADH	0.5mg	
NADH 溶解液	1mL	
乙醇脱氢酶	0.5mL	
显色液	1.1mL	
反应缓冲液	10mL	

1、NADH 标准溶液的配制: 使用 665μL NADH 溶解液溶解 NADH, 配制成 1mM NADH 标准溶液。(注: 由于 NADH 不稳定, 需现用现配, 建议 1mM 的 NADH 溶液适当分装并于 -80℃ 避光储存)

2、NADH 标准曲线的设置: 用 NAD⁺/NADH 提取液将 1mM NADH 标准溶液梯度稀释为 0μM、0.25μM、0.5μM、1μM、2μM、4μM、6μM、8μM、10μM 等几个浓度, 在 96 孔板每孔加入 20μL 标准液, 即每孔标准品含量为 0pmol、5pmol、10pmol、20pmol、40pmol、80pmol、120pmol、160pmol、200pmol。(注: 标准品浓度 0μM 为空白对照, 仅含 NAD⁺/NADH 提取液)

3、乙醇脱氢酶工作液的制备: 每个标准品或样品需要 90μL 乙醇脱氢酶工作液, 根据实验样品用反应缓冲液将其稀释到 20 倍工作液。(注: 乙醇脱氢酶工作液现用现配)

一、产品说明

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 作为辅酶参与到很多氧化还原反应中, 存在氧化型 (NAD⁺) 和还原型 (NADH) 两种形式。

翼飞雪 NAD⁺/NADH 含量检测试剂盒 (WST-8 法) 基于 WST-8 的显色反应, 无需从样品中纯化 NAD⁺/NADH, 通过比色法检测细胞、组织或其他样品中氧化型辅酶 I (NAD⁺) 和还原型辅酶 I (NADH) 分别的含量、比值及总含量的试剂盒。

检测原理如下

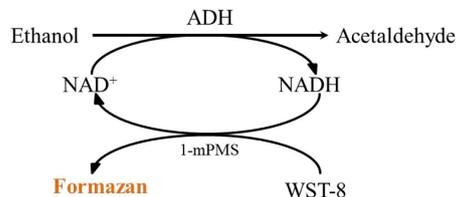
1、检测氧化型辅酶 I (NAD⁺) 和还原型辅酶 I (NADH) 总量: 乙醇 (Ethanol) 在乙醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH) 的作用下氧化生成乙醛 (Acetaldehyde), 在这一反应过程中, 氧化型辅酶 I (NAD⁺) 被还原称为还原型辅酶 I (NADH), 生成的 NADH 在电子耦合试剂 (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate, 1-mPMS) 的作用下将 WST-8 还原成橙黄色的甲臞 (Formazan), 检测甲臞在 450nm 处的吸光值, 体系中生成甲臞的量与 NAD⁺和 NADH 总量成线性关系。

2、检测还原型辅酶 I (NADH) 含量: 样本经过 60℃ 加热 30 min 预处理后, 体系中的氧化型辅酶 I (NAD⁺) 将分解只保留还原型辅酶 I (NADH), 还原型辅酶 I (NADH) 将

WST-8 还原成橙黄色的甲臞 (Formazan), 通过比色法确定甲臞 (Formazan) 生成量来确定样品中还原型辅酶 I (NADH) 含量。

3、检测氧化型辅酶 I (NAD⁺) 含量及氧化型辅酶 I (NAD⁺) 与还原型辅酶 I (NADH) 比值: 根据前两步检测得出样本中氧化型辅酶 I (NAD⁺) 含量及氧化型辅酶 I (NAD⁺) 与还原型辅酶 I (NADH) 的比值。

WST-8 法检测 NAD⁺/NADH 总量原理如右图:



二、样品准备

- 1、组织: 用预冷的 PBS 清洗组织, 取 10-30mg 组织样品, 用剪刀剪碎置于匀浆器中, 加入预冷的 400 μ L NAD⁺/NADH 提取液, 冰上匀浆, 4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 10min, 取上清待测。
- 2、贴壁细胞: 取 1 \times 10⁶ 个细胞 (6 孔板单孔长满细胞数量), 尽可能吸除培养液, 加入预冷的 200 μ L NAD⁺/NADH 提取液, 冰上轻轻吹打约 10min 使细胞裂解, 4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 10min, 取上清待测。
- 3、悬浮细胞: 取 1 \times 10⁶ 个细胞, 600g 离心 5min, 尽可能吸除培养液, 加入预冷的 200 μ L NAD⁺/NADH 提取液, 冰上轻轻吹打约 10min 使细胞裂解, 4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 10min, 取上清待测。

三、含量测定

1、样品中 NAD⁺/NADH 总含量的检测: 吸取 20 μ L 待测样品至 96 孔板中。

注: 为减少实验误差, 建议设置 3-5 个复孔。

2、样品中 NAD⁺、NADH 含量或 NAD⁺/NADH 比值的检测: 吸取 50-100 μ L 待测样品离心管中, 60 $^{\circ}$ C 水浴或金属浴 30min, 使 NAD⁺ 充分溶解。

注: 为减少实验误差, 建议设置 3-5 个复孔。

3、参考下表使用 96 孔板设置反应体系:

试剂 (μ L)	空白对照	标准品	样品
待测样品	-	20	20
NAD ⁺ /NADH 提取液	20	-	-
乙醇脱氢酶工作液	90	90	90

4、37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10min, 使样品中的 NAD⁺ 还原成 NADH。

5、充分混匀显色液, 每孔加入 10 μ L 显色液并充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min, 检测 450nm 处的吸光值。

注: 1) 最终检测如出现 NAD⁺ 和 NADH 总量超过标准曲线范围, 可用 NAD⁺/NADH 提取液对样品进行适当稀释后再进行检测, 反之如检测总量过低, 则需增加细胞或组织用量。

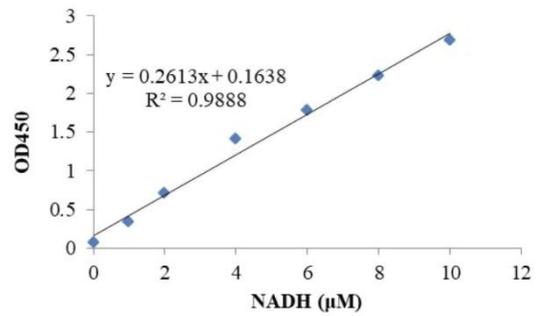
2) 加入乙醇脱氢酶工作液时需轻柔操作, 尽量避免产生气泡, 若出现气泡可用小吸头或针头戳破。

3) 加入显色液后如果显色较浅, 可适当延长孵育时间至 45-60min。

6、含量的计算:

A. 根据读数计算标准样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. 绘制标准曲线: 以 NADH 浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制出标准曲线 (如下图):
C. 根据标准曲线计算 NAD⁺和 NADH 总浓度或 NADH 浓度, 其中未经过 60℃ 水浴或金属浴加热处理组, 计算得到 NAD⁺和 NADH 总浓度 (NAD⁺+NADH), 经过 60℃ 水浴或金属浴加热处理组, 计算得到 NADH 浓度。



D. 根据检测得到的浓度以及样品的体积及以下公式, 计算出 NAD⁺、NADH 含量和 NAD⁺/NADH 总量 (NAD⁺+NADH) :

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

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

注: 1) 可用单位细胞数量或单位组织重量中的含量表示 NAD⁺、NADH 含量和 NAD⁺/NADH 总量。

2) 也可通过 BCA 法检测样品中蛋白浓度, 最终用单位蛋白量换算 NAD⁺、NADH 含量或 NAD⁺/NADH 总量。

四、注意事项

- 1、使用前, 将冻存的各组充分融解并轻轻混匀后再使用。
- 2、NADH 配制成溶液后, 适当分装后-80℃ 储存; 如发现标准曲线不理想, 有可能是标准品发生了降解。
- 3、NAD⁺/NADH 提取液比较粘稠, 稀释过程中务必保证稀释均匀, 否则易造成实验数据不稳定。
- 4、检测过程中, 应尽量避免产生气泡, 以免影响最终的吸光度值的测定。
- 5、每次检测都要重新绘制标准曲线。
- 6、NAD⁺和 NADH 不稳定, 在冻存过程中容易降解, 建议使用新鲜样品进行检测。
- 7、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。