改良型 NAD+/NADH 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 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℃
NADH	0.5mg	-20℃
NADH 配制液	1mL	-20℃
乙醇脱氢酶	0.5mL	-20℃
显色液	1.1mL	-20℃
反应缓冲液	10mL	-20℃

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酶催化的氧化还原反应中，存在氧化型(NAD+)和还原型(NADH)两种形式。NAD^+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)无需从样品中纯化 NAD^+/NADH，基于 WST-8 的显色反应，通过比色法检测细胞、组织或其他样品中氧化型辅酶|(NAD+)和还原型辅酶 (NADH)各自的含量、比值及总含量的试剂盒。

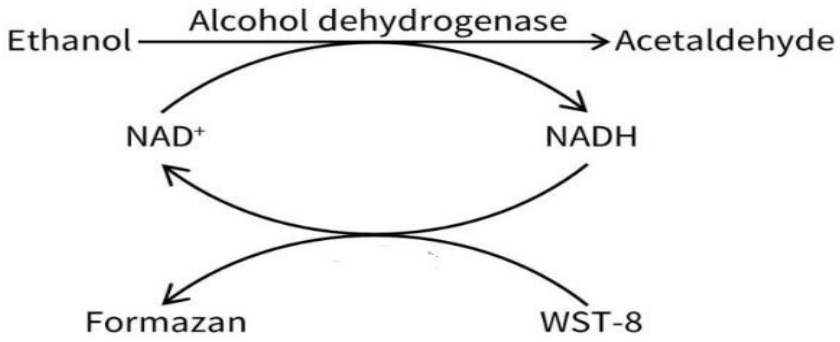
检测原理如下

检测氧化型辅酶|(NAD+)和还原型辅酶(NADH)总量:乙醇(Ethano)在乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)的作用下氧化生成乙醛(Acetaldehyde)，这一反应过程中氧化型辅酶(NAD+)被还原成还原型辅酶(NADH)，生成的 NADH 在电子载体存在下将 WST-8 还原成检黄色的甲臜(Formazam)，在 450 nm 处有最大吸收峰，体系中生成甲臜的量与 NAD^+/NADH 总量呈线性关系。

检测还原型辅酶(NADH)含量: NAD+在给定的缓冲体系中不稳定，样本经过 60°C 加热 30 min 预处理后，体系中的氧化型辅酶(NAD+)分解，只保留还原型辅酶(NADH)，还原型辅酶(NADH)将 WST-8 还原成橙黄色的甲臜, 通过比色法确定甲臜生成量来确定样品中还原型辅酶(NADH)含量。

检测氧化型辅酶(NAD+)含量：根据上述 NAD^+/NADH 总量及还原型辅酶(NADH)的量，二者差值即为氧化型辅酶(NAD+)含量。据此计算出氧化型辅酶(NAD+)与还原型辅酶(NADH)比值。

WST-8 法检测 NAD+/NADH 总量原理图



二、试剂准备

1、NADH 标准溶液配制: 0.5mg NADH 用 665μL NADH 配制缓冲液溶解，配制成 1mM NADH 标准溶液。(**注:**由于 NADH 稳定性较差, 建议将 NADH(1mM)溶液适当分装, 于 -80°C 避光保存。)

2、NADH 标准曲线的配置：用 NAD+/NADH 提取缓冲液将 1mM NADH 梯度稀释为 0-10μM，如：0μM、0.25μM、0.5μM、1μM、2μM、4μM、6μM、8μM、10μM 几种浓度，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:** A. 0μM 为空白对照，仅含 NAD+/NADH 提取液； B. 根据实验需求配制不同浓度梯度的 NADH 溶液, 建议现配现用。)

3、乙醇脱氢酶工作液配制:每个标准品或样品需要 90μL 乙醇脱氢酶工作液，根据实验样品取适量乙醇脱氢酶（ADH Enzyme）母液，用反应缓冲液将其稀释 20 倍制备工作液。（**注:** 请适量配制乙醇脱氢酶工作液并现配现用。）

三、样品准备

1、组织：用预冷的 PBS 清洗组织后，取 10-30mg 组织样品，用剪刀剪碎置于匀浆器中，加入预冷的 400μL NAD+/NADH 提取液，冰上匀浆。

2、贴壁细胞：取 1×10^6 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 200μL NAD+/NADH 提取液，冰上轻轻吹打使细胞裂解。

3、悬浮细胞：取 1×10^6 个细胞，600g 离心 5min，尽可能吸除培养液，加入预冷的 200μL NAD+/NADH 提取液，冰上轻轻吹打使细胞裂解。

4、裂解过程 10min 左右，4°C 12000g 离心 5-10min，取上清即为待测样品。

四、含量测定

1、样品中 NAD+/NADH 总含量的检测：吸取 20μL 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 比值检测:吸取 50μL-100μL 待测样品至离心管中，60°C 水浴或金属浴加热 30min 使 NAD+充分分解。

3、参考下表使用 96 孔板设置反应体系：

试剂种类（μL）	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℃避光孵育 10min，使样品中的 NAD+还原成 NADH。
5、每孔加 10μL 显色液并混匀，37℃避光孵育 30min，加入显色液后酶促循环反应即开始，橙黄色甲臜开始生成，检测 450nm 处的吸光度。（**注:** A. 最终实验如发现样品中 NAD+和 NADH 总量过高超出标准曲线范围，可用 NAD=/NADH 提取缓冲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； B. 在加入乙醇脱氢酶工作液过程中必须轻柔操作，以免产生气泡，影响反应的均一性。C. 加入显色液后如果显色较浅，可适当延长孵育时间至 45-60min，延长孵育时间，颜色会加深。）

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。
7、根据标准曲线计算细胞、组织样品中 NAD+和 NADH 总浓度或 NADH 浓度(未经过 60°C 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°C 水浴或金属浴加热处理组，计算得到 NADH 浓度）。NAD+浓度为总浓度(NAD^++NADH)减去 NADH 浓度。（**注:** A. 可以用单位细胞数量或单位组织重量中的含量来表示 NAD+、NADH 含量和 NAD+/NADH 总量； B. 也可以通过 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。。）

五、注意事项

1、 使用前，将冻存的各组分充分融解并轻轻混匀后再使用。
2、 NADH 配制成溶液后，建议分装后-80°C 保存。NADH 不稳定，如果发现标准曲线不理想，有可能是标准品发生了降解，此时建议用新的 NADH 粉末重新配置标准液。
3、 NAD+/NADH 提取缓冲液比较粘稠，稀释过程中务必保证稀释均匀，否则易造成实验数据波动。在检测过程中，应尽量避免产生气泡，以免影响最终的吸光度测定。
4、 建议每次检测都重新绘制标准取曲线。
5、 NAD+和 NADH 不稳定，样品在冻存过程中较易降解，建议使用新鲜样品进行检测。
6、 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。
7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。