NAD^+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)

产品编号：MA1534　　规格：100T

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1534-1 100T	保存条件	有效期	运输条件
乙醇脱氢酶	220μL	-20℃	自生产之日 12 个月	湿冰运输
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℃		
说明书	1 份			

产品简介

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide adenine dinucleotide，NAD）是广泛存在于各类细胞中的关键辅酶，包含氧化型 NAD^+与还原型 NADH 两种存在形式。NAD^+在细胞代谢调控、基因表达、细胞凋亡等生理过程中发挥核心作用，其含量下降是诱导细胞损伤与死亡的重要诱因。传统 NAD^+/NADH 检测依赖 340 nm 吸光度测定，存在灵敏度低、抗干扰能力差等缺陷，检测效果有限。

NAD^+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)，即 NAD^+/NADH Assay Kit，基于 WST-8 显色体系，可精准检测细胞、组织等样本中 NAD^+、NADH 的单独含量、二者比值及总含量，且特异性优异，仅识别 NAD^+/NADH，不与 $NADP^+$/NADPH 发生反应。检测反应中，样本内 NAD^+可被还原为 NADH，生成的 NADH 可进一步还原 WST-8，产生橙黄色甲臜产物（formazan），该产物在 450 nm 波长处具有最大吸收峰，其生成量与样本中 NAD^+或 NADH 总含量呈正比，可通过比色法实现精准定量检测。

使用方法(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，600×g 离心 5min，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 12,000×g，4℃离心 5-10min，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 12,000×g，4℃离心 5-10min，取上清作为待测样品备用。

二、试剂的准备：

1. 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】粉剂量在 mg 级别，使用前用手甩几次或者进行离心，小心打开直接加入要求的试剂即可。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、10 μM，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、200 pmol 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 0 μM 的点为空白对照点，仅含 NAD⁺/NADH 提取液。

【注】由于 NADH 很不稳定，故配制后的 NADH 标准梯度需尽快使用。

3. 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 2μL 乙醇脱氢酶加入到 88μL 的反应缓冲液中，即可获得 90μL 的乙醇脱氢酶工作液。每个标准品或样品的检测需要使用 90μL 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：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2. 样品中 NAD⁺和 NADH 的总量的测定：吸取 20μL 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。

3. 样品中 NAD⁺、NADH 的含量或者 NAD⁺/NADH 比值的测定：吸取 50-100μL 待测样品于离心管中，60℃水浴或 PCR 仪上加热 30min 以分解 NAD+。如果加热后产生不溶物，则需 10,000×g，室温或 4℃离心 5min，吸取 20μL 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。

4. 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	—	20μL	20μL
NAD⁺/NADH 提取液	20μL	—	—
乙醇脱氢酶工作液	90μL	90μL	90μL

5. 37℃避光孵育 10min。

【注】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。

6. 适当混匀显色液，然后每孔加入 10μL 显色液，混匀，37℃避光孵育 30min，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 45-60min。

四、结果计算：

1. 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。

2. 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。

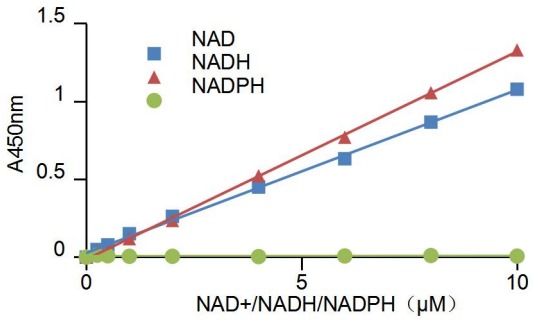


图 1. NAD+和 NADH 的标准曲线

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。

3. 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。未进行 60℃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℃加热处理后，检测得到的是样品中 NADH 的浓度。

【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。

$$[NAD^+] = [NAD\ total] - [NADH]$$

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

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. 所有试剂开封后请尽快使用，避免反复冻融，以防影响后续实验效果。
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. 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

大连美仑生物技术有限公司
官网:https://www.meilunbio.com/
电话/邮箱:0411-62910999 sales@meilune.com
本产品仅供科研使用