



NAD⁺/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0005	乙醇脱氢酶(ADH)	0.5mL
	显色液(Chromogen Solution)	1.1mL
	NADH	0.5mg
	NADH 配制液	1mL
	NAD ⁺ /NADH 提取液	50mL
	反应缓冲液(Reaction Buffer)	10mL
	说明书	1 份

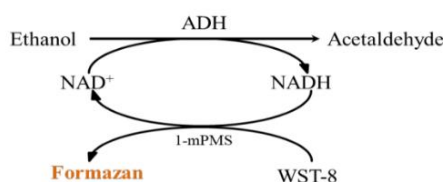
产品简介

NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)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。

默科的 NAD⁺/NADH 检测试剂盒 (WST-8 法) 是无需从样品中纯化 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 I (NAD⁺) 和还原型辅酶 I (NADH) 各自的含量、比值及总含量的试剂盒。

检测原理如下:

1. 检测 NAD⁺ 和 NADH 的总量: 乙醇 (Ethanol) 在乙醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH) 的作用下氧化生成乙醛 (Acetaldehyde), 这一反应过程中 NAD⁺ 被还原成 NADH; 生成的 NADH 在电子耦合试剂 1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate) 的作用下将 WST-8 还原成橙黄色的 (Formazan), 甲臢(Formazan)在 450 nm 处有最大吸收峰, 体系中生成的甲臢的量与 NAD⁺ 和 NADH 的总量呈线性关系。
2. 检测 NADH 的量: 样本经过 60℃加热 30 min 预处理后, 体系中的 NAD⁺ 将分解只保留 NADH, NADH 将 WST-8 还原成橙黄色的甲臢(Formazan), 通过比色法确定甲臢(Formazan)生成量来确定样品中 NADH 的含量。
3. 检测 NAD⁺ 的量及 NAD⁺/NADH 的比值: 根据前两步检测获得的 NAD⁺ 和 NADH 的总量以及 NADH 的量, 即可计算得到样品中 NAD⁺ 的量以及 NAD⁺/NADH 的比值。



WST-8 法检测 NAD⁺/NADH 总量原理图

保存条件

-20℃保存, 有效期一年。

显色和 NADH 须-20℃避光保存。

NADH 配制成溶液后, 须适当分装后-80℃保存。

所有试剂避免反复冻融。

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使用。
2. NADH 配制成溶液后, 适当分装后-80℃保存。NADH 不稳定, 如果发现标准曲线不理想, 很有可能是标准品发生了降解。
3. NAD⁺/NADH 提取液比较粘稠, 以该提取液作为稀释液时, 无论对标准品还是样品进行稀释, 稀释过程中务必保证稀释均匀, 否则易造成实验数据产生较大波动。
4. 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。
5. 如果不能非常严格地控制反应温度和反应时间, 建议每次检测都重新绘制标准曲线。
6. 如果样品溶液中 NAD⁺和 NADH 浓度过高或过低, 不在试剂盒的线性检测范围内时, 可适当调整样品或者提取液的用量。



7. NAD^+ 和 NADH 不稳定，在冻存过程中较易降解，建议使用新鲜样品进行检测。如果需要进行样品中 NAD^+ 以及 NAD^+/NADH 比值的测定，在样品加热 30 分钟以分解 NAD^+ 的过程中，可以先进行样品中 NAD^+ 和 NADH 的总量的测定，即将 NAD^+ 和 NADH 的总量的测定和单独 NADH 的测定分开进行，尽量减少样品在等待过程中因为可能的降解导致的误差。

8. 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，不得存放于普通住宅内。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. 反应液准备

(1) NADH 标准溶液配制：0.5 mg NADH 用 665 μL NADH 配制液溶解，配制成 1 mM NADH 标准溶液。

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

(3) 乙醇脱氢酶工作液配制：每个标准品或样品需要 90 μL 乙醇脱氢酶工作液，根据实验样品取适量乙醇脱氢酶用反应缓冲液将其稀释 20 倍制备工作液。

注：①由于 NADH 不稳定，需现配现用，建议 NADH (1 mM) 溶液适当分装并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存。②请适量配制乙醇脱氢酶工作液并现配现用。

2. 样品准备

细胞样品准备：

(1) 贴壁细胞，取 1×10^6 个细胞（6 孔板单孔长满细胞量），吸净培养液，加入预冷 200 μL NAD^+/NADH 提取液，轻轻吹打使细胞裂解。悬浮细胞，取 1×10^6 个细胞，600 g 离心 5 min，吸净培养液，加入预冷 200 μL NAD^+/NADH 提取液，轻轻吹打使细胞裂解。

(2) 裂解过程 10 min 左右，裂解过程在室温或冰上操作均可。

(3) 随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 g 离心 5-10 min，取上清作为待测样品备用。

组织样品准备：

(1) 组织样品用预冷 PBS 清洗，取 10-30 mg 组织样品，用剪刀剪碎并置于匀浆器中，加入预 400 μL NAD^+/NADH 提取液在室温或冰上进行匀浆。

(2) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 g 离心 5-10 min，取上清即为待测样品。

3. 检测

(1) 样品中 NAD^+/NADH 总量检测：吸取 20 μL 待测样品至 96 孔板中，为减少实验误差建议设置 3-5 个复孔。样品中 NAD^+ 、 NADH 含量或 NAD^+/NADH 比值检测：吸取 50 μL -100 μL 待测样品至离心管中，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴或金属浴加热 30 min 使 NAD^+ 充分分解。

(2) 参考下表使用 96 孔板设置反应体系。

	空白对照	标准品	样品
待测样品	/	20 μL	20 μL
NAD^+/NADH 提取液	20 μL	/	/
乙醇脱氢酶工作液	90 μL	90 μL	90 μL

(3) 7 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min。孵育的目的是将样品中的 NAD^+ 还原 NADH 。

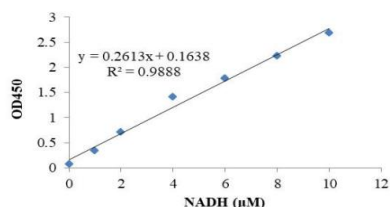
(4) 混匀显色液，每孔加 10 μL 显色液并混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。加入显色液后反应即开始，橙黄色甲臌 (Formazan) 开始生成，检测 450 nm 处的吸光度。

注：①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，若出现气泡可用小枪头或针头戳破。③加入显色液后如果显色较浅，可适当延长孵育时间至 45-60 min，延长孵育时间，颜色会加深。

4. 计算

(1) 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。

(2) 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）。



(3) 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。其中未经过 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴或金属浴加热处理组，计算得到 NAD^+ 和 NADH 总浓度($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$)，经过 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴或金属浴加热处理组，计算得到 NADH 浓度。

(4) 根据检测得到的浓度及样品的体积及以下公式，计算出 NAD^+ 、 NADH 含量和 NAD^+/NADH 总量($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$)。

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

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



默科南京

Hot line: 025-69867707

注: ①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。②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。