NAD+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)

NAD+/NADH Assay Kit with WST-8

产品介绍

NAD+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法) (NAD+/NADH Assay Kit with WST-8)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。

NADP+/NADPH 以及 NAD+/NADH 的传统检测方法是检测 340nm 处吸收波长的变化，易受样品中有类似紫外吸收物质的干扰，并且在紫外检测过程中通常需要加大检测样品量以弥补 NADPH 在 340nm 处吸光度过小的不足，因此该检测方法具有很大的局限性。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品。WST-8 产生的 formazan 都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤。并且 WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。再次，WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定，使实验结果更加稳定。另外，WST-8 和 MTT、XTT、 WST-1 等相比，线性范围更宽，灵敏度更高。

本试剂盒使用便捷，无需分离纯化细胞、组织或其它样品中的 NAD^+和 NADH，并且能特异性检测 NAD+和 NADH，而不检测 $NADP^+$和 NADPH。可以检测含量低至 0.25μM (5pmol)的 NAD+或 NADH，在 0.25μM (5pmol)至 10μM (200pmol)之间呈现良好的线性关系。

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。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，并且 NAD+的减少是细胞死亡的主要因素之一。虽然 NMNAT (nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase)是 NAD+的合成酶，包括 Nmnat1、Nmnat2 和 Nmnat3，但 NAMPT (Nicotinamide phosphoribosyl transferase)通常被认为是 NAD+合成的限速酶。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。

本试剂盒可检测样品中的 NAD+、NADH 以及它们的比值，具体原理如下：

1) 测定 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)，在这一反应过程中 NAD+被还原为 NADH；生成的 NADH 在电子耦合试剂作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan，在 450nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中 NAD+和 NADH 的总量呈比例关系。WST-8 法检测 NAD+和 NADH 总量的原理参考图 1。

2) 单独测定 NADH 的量：60℃水浴加热 30 分钟后，样品中 NAD+会分解而只保留 NADH。NADH 将 WST-8 还原成 formazan，通过比色法确定反应生成的 formazan 的量，最终可以确定样品中 NADH 的量。

3) 测定 NAD+以及 NAD+/NADH 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。

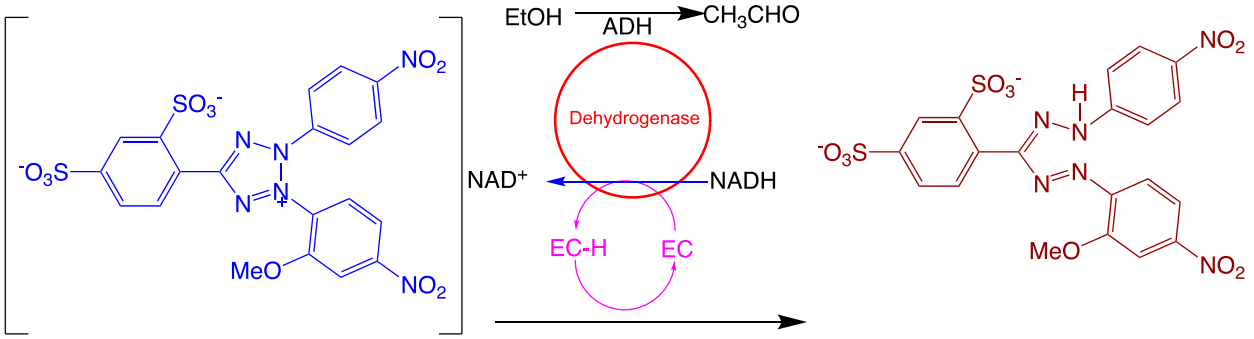

图 1. WST-8 法检测 NAD+和 NADH 总量的原理图。

本试剂盒适用于检测细胞、组织以及其它适当样品中的 NAD+和 NADH 各自的量、比值和总量。

在检测组织及其它样品中的 NAD+、NADH 以及它们的比值时，考虑到有些样品本身的颜色对 450nm 处吸光值的检测有影响，建议设置加入样品而不加入乙醇脱氢酶的对照。

当仅检测样品中NAD+和NADH的总量或NADH的量时，一个本试剂盒可以进行100次检测；当检测NAD+或者NAD+/NADH的比值时，一个本试剂盒可以进行50次检测。

注意事项:

1)试剂盒中所有组份均要冷冻保存。如果不是一次用完，为避免反复冻融导致产品失效，请适当分装后保存。
2) NADH 不稳定，取出 NADH 后请尽快使用。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）由于 NAD+/NADH 提取液本身比较粘稠，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，在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）在样品加样和混匀过程中，须尽量避免产生气泡，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，每次检测都需要设置标准曲线。
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）由于 NAD+和 NADH 很不稳定，在冻存过程中较易降解，所以宜尽量使用新鲜样品进行检测。
8）本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究，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。
9） 本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！

试剂盒组份:

Cat No	Components	Quantity	Storage
16035-A	乙醇脱氢酶 ADH	50uL	-20°C Protect from light 1 year
16035-B	显色液	220uL	-20°C Protect from light 1 year
16035-C	NADH	1mg	-20°C Protect from light 1 year
16035--D	NADH 配制液	160uL	-20°C Protect from light 1 year
16035--E	NAD+/NADH 提取液	12mL	-20°C Protect from light 1 year
16035--F	反应缓冲液	2mL	-20°C Protect from light 1 year

保存条件:

密封避光-20℃保存，一年有效。显色液(16035-B)和 NADPH (16035-C)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。

使用方法:

1. 样品的准备:

1.1） **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 200uL 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，600g 离心 5 分钟，吸净培养液，用移液器加入 200uL 冰浴预冷的 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 12,000g，4℃离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品备用。

1.2） **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 400uL 的 NAD+/NADH 提取液在室温或冰上进行匀浆。随后 12,000g，4℃离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品备用。

2. 试剂盒的准备工作:

2.1）**NADH 标准品的配制**：吸取 1 3 3 uL NADH 配制液，充分溶解本试剂盒提供的 1 mg NADH 后即得到 10mM NADH 标准品。10mM NADH 标准品请适当分装后-80℃避光保存。

2.2）**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、10μM 这几个浓度，检测时 96 孔板中每孔加入 20uL 的标准品，相当于每孔为 0、5、10、20、40、80、120、160、200pmol 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 0μM 的点为空白对照点，仅含 NAD+/NADH 提取液。注意：由于 NADH 很不稳定，故配制后需尽快使用。

2.3）**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 2uL 乙醇脱氢酶加入到 88uL 的反应缓冲液中，即可获得 90uL 的乙醇脱氢酶工作液。每个标准品或样品的检测需要使用 90uL 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。

3. 样品测定:

3.1) 样品中 NAD+和 NADH 的总量的测定：吸取 20uL 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。

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

3.3) 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	-	20uL	20uL
NAD+/NADH 提取液	20uL	-	-
乙醇脱氢酶工作液	90uL	90uL	90uL

3.4) 37℃避光孵育 10 分钟。说明：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。

3.5) 适当混匀显色液，然后每孔加入 10uL 显色液，混匀，37℃避光孵育 30 分钟，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 45-60 分钟。

4. 样品中 NAD+/NADH 量的计算:

4.1) 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。

4.2) 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 2。

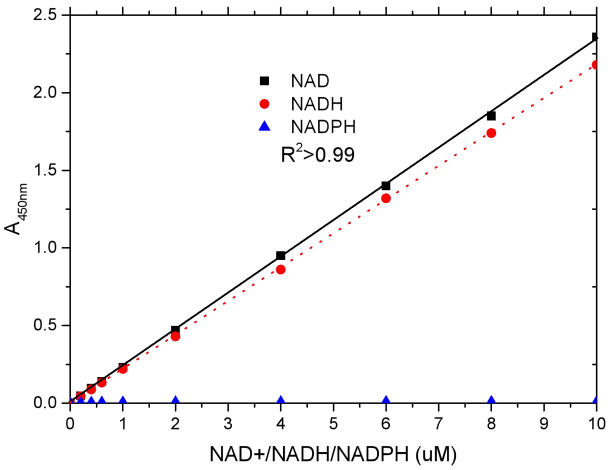

图 2. NAD+和 NADH 的标准曲线。上图显示本试剂盒可以很好地检测出 NAD+和 NADH 的含量，并且不会受 NADPH 的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

4.3) 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 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。

备注：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。

4.4) 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。一些细胞和组织中 NAD+和 NADH 的含量和比值可以参考图 3 和图 4。

$[NAD+] = [NAD_{total}] - [NADH]$

$[NAD+]/[NADH] = ([NAD_{total}] - [NADH])/[NADH]$

4.5) 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。