

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K804-M

产品规格: 96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(450 nm)

Elabscience® NAD⁺/NADH 比色法试剂盒(WST-8 法)

NAD⁺/NADH Colorimetric Assay Kit (WST-8)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织和细胞样本中 NAD^+ 和 NADH 各自的含量、比值和总含量。

检测原理

氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)是氧化还原反应过程中传递电子的辅酶,可以作为很多酶的辅助因子来参与细胞内反应。

测定 NAD^+ 和 NADH 总量:

乙醇在酶作用下生成乙醛,在这一反应过程中 NAD^+ 转化为 NADH , NADH 在电子耦合试剂的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色物质,在 450 nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成橙黄色物质颜色深浅反应样品中 NAD^+ 和 NADH 的量。

单独测定 NADH 的量:

样本经过提取后,60℃水浴加热 30 min,样本中的 NAD^+ 会分解而只保留 NADH 。 NADH 将 WST-8 还原生成黄色物质,可以单独测定样本中 NADH 的量。

测定 NAD^+ 以及 NAD^+/NADH 的比值:

根据前两步检测获得的 NAD^+ 和 NADH 总量以及 NADH 单独的量,即可得到样本中 NAD^+ 的量以及 NAD^+ 与 NADH 的比值。

在上述测定过程中,由于酶试剂的专一性, NADP^+ 和 NADPH 对测定结果无影响。

本试剂盒检测样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	16 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	5 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

本试剂盒仅测 NAD⁺和 NADH 的总量或者样本中 NADH 的量时，一个试剂盒可以测定 80 个样本；当测定 NAD⁺或者 NAD⁺和 NADH 的比值时，一个试剂盒可以测定 40 个样本。

所需自备物品

仪器：酶标仪(450 nm)，恒温水浴锅、37℃ 恒温箱

试剂：PBS(0.01 M, pH 7.4)

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液配制：

每支试剂四粉剂用200 μL 的双蒸水充分溶解，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置5 h后使用，未用完部分4 $^{\circ}\text{C}$ 可避光保存7天。

③ 反应工作液的配制：

将试剂四工作液与试剂二按体积比为1：39混匀，临用前按需配制，现配现用，避光保存，配好的工作液在2 h内使用有效。

④ 250 $\mu\text{mol/L}$ 标准品储备液的配制：

每支试剂五用200 μL 双蒸水充分溶解，未用完部分-20 $^{\circ}\text{C}$ 可避光保存7天。

⑤ 5 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液的配制：

按照250 $\mu\text{mol/L}$ 标准品储备液：试剂一体积比为1：49的比例稀释，即得5 $\mu\text{mol/L}$ 标准品，临用前按需现配现用，避光保存，1天内使用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	1	1.5	2	2.5	3.5	4.0	5.0
5 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	40	60	80	100	140	160	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	100	60	40	0

样本准备

① 样本处理

样本匀浆：

组织样本：匀浆介质为试剂一，4℃ 10000 ×g 离心 10 min，取上清液，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：冰上预冷的 PBS(0.1 M, pH 7.4)洗涤细胞后，取约 1.5×10^6 个细胞，加入 0.4 mL 预冷的试剂一匀浆，4℃，12000 ×g 离心 10 min，取上清液，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

样本超滤：

组织和细胞的匀浆液中含有能分解 NAD⁺ 的酶，建议在样本提取离心后，将上清液用 10 KD 超滤管 4℃，10000 ×g 离心 10 min，除去分解酶。

测定 NAD⁺ 和 NADH 总量时，取超滤管过滤后的待测样本上清液直接测定。

如要单独测定 NADH 的量，可取适量待测样本超滤后滤液于 EP 管中，60℃ 水浴 30 min，流水冷却后混匀待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.02-5.0 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肌肉	不稀释	293T 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	Hela 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 每支试剂四粉剂用 200 μL 的双蒸水充分溶解后，需 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 5 h 后再使用，注意提前准备。
- ② 尽量选用新鲜的样本进行测定，冻存样本后会降低测定结果或测不出值。
- ③ 样本提取液 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min 分解 NAD^+ ，此过程 EP 管要密封防止液体挥发；加热完成后，由于水汽凝结，需要充分混匀后进行下一步操作。

操作步骤

- ① 测定孔：取 20 μL 待测样本，加入到酶标板对应的测定孔中。
标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品，加入到酶标板对应的标准孔中。
- ② 取 120 μL 反应工作液加入到步骤①中的测定孔和标准孔中。
- ③ 向②中测定孔和标准孔中加入 40 μL 的试剂三。
- ④ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中准确孵育 30 min 后，酶标仪于波长 450 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
待测样本(μL)	--	20
不同浓度标准品(μL)	20	--
反应工作液(μL)	120	120
试剂三(μL)	40	40
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中准确孵育 30 min，酶标仪于波长 450 nm 处测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

样本中 NAD^+ 和 NADH 总量的计算公式:

$$\text{NAD}_{\text{total}} \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

样本中 NADH 含量的计算公式:

$$\text{NADH} \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

样本中 NAD^+ 含量的计算公式:

$$\text{NAD}^+ \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = \text{NAD}_{\text{total}} - \text{NADH}$$

样本中 NAD^+ 与 NADH 的比值计算公式:

$$\text{NAD}^+/\text{NADH} = (\text{NAD}_{\text{total}} - \text{NADH})/\text{NADH} \times 100\%$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA : 测定孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

C_{pr} : 超滤管过滤前的上清液蛋白浓度(gprot/L)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

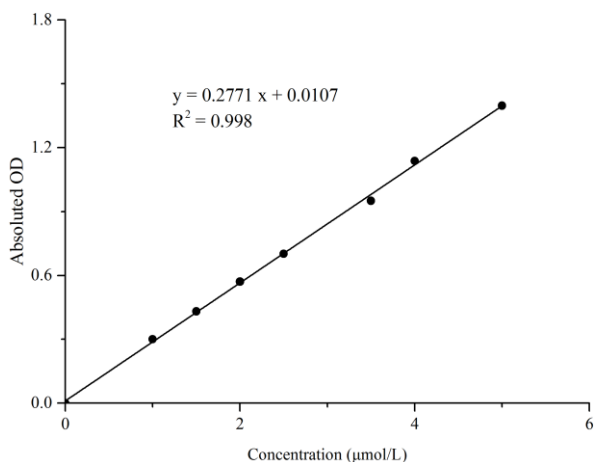
检测范围	0.02-5.0 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	9.1 %
灵敏度	0.02 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	1.8 %
平均回收率	90 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，各管OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	1	1.5	2	2.5	3.5	4.0	5.0
OD 值	0.148	0.451	0.571	0.728	0.843	1.038	1.290	1.576
	0.158	0.456	0.597	0.720	0.866	1.168	1.291	1.525
平均 OD 值	0.153	0.454	0.584	0.724	0.854	1.103	1.290	1.550
绝对 OD 值	0.000	0.301	0.431	0.571	0.701	0.950	1.137	1.397

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

例如检测小鼠肌肉组织(数据仅供参考):

取的10%新鲜小鼠肌肉组织上清液20 μL ，按操作表检测，结果如下:

标准曲线: $y = 0.2771x + 0.0107$ ，空白孔平均OD值为0.158，测定 NAD^+ 和 NADH 总量时，测定孔的平均OD值为0.565；单独测定 NADH 的含量时，测定孔平均OD值为0.466，测定蛋白浓度为2.80 gprot/L 则计算结果为:

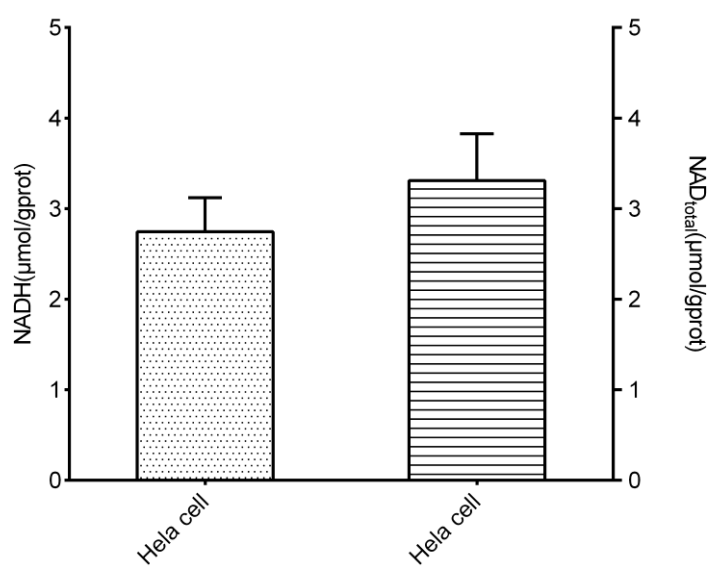
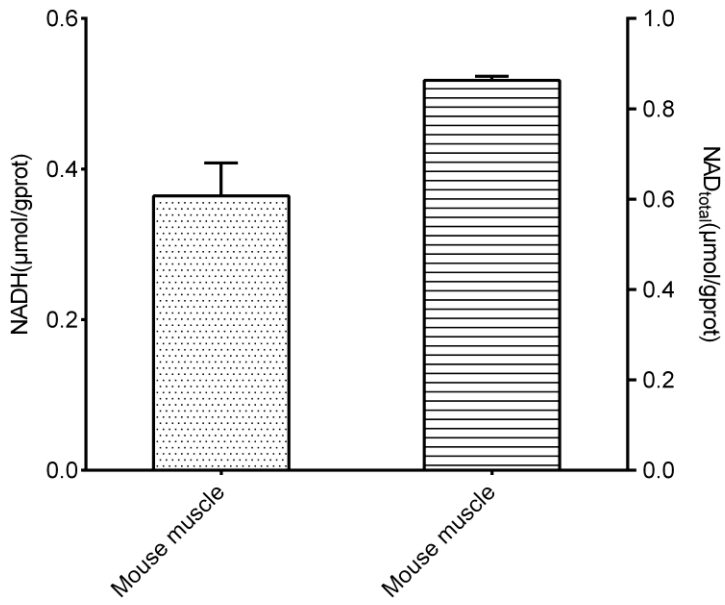
$$\text{NAD}_{\text{total}} \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = (0.565 - 0.158 - 0.0107) \div 0.2771 \div 2.80 = 0.510 \mu\text{mol/gprot}$$

$$\text{NADH} \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = (0.466 - 0.158 - 0.0107) \div 0.2771 \div 2.80 = 0.383 \mu\text{mol/gprot}$$

$$\text{NAD}^+ \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = 0.510 - 0.383 = 0.127 \mu\text{mol/gprot}$$

$$\text{NAD}^+/\text{NADH} = (0.510 - 0.383)/0.383 \times 100\% = 33.2\%$$

按照说明书，测定10%新鲜小鼠肌肉组织(加样量20 μL ，蛋白浓度2.80 gprot/L)和Hela细胞匀浆液(加样量20 μL ，蛋白浓度0.05 gprot/L)中 NAD^+ 和 NADH 的总量及 NADH 单独的量(如下图所示，其中左边柱形图表示 NADH 的量，右边柱形图表示 NAD^+ 和 NADH 的总量):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675