



默科南京

Hotline: 025-69867707

## NAD<sup>+</sup>/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)

### NAD<sup>+</sup>/NADH Assay Kit (WST-8)

#### 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 <sup>+</sup> /NADH 提取液	50mL
	反应缓冲液(Reaction Buffer)	10mL
	说明书	1 份

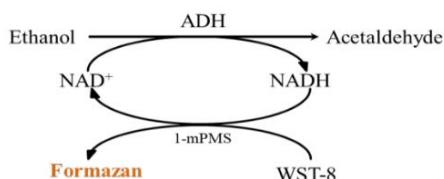
#### 产品简介

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<sup>+</sup> (氧化型) 和 NADH (还原型) 两种形式。NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/NADH 检测试剂盒 (WST-8 法) 是无需从样品中纯化 NAD<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>) 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. 检测氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 和还原型辅酶 I (NADH) 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)，这一反应过程中氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 被还原成还原型辅酶 I (NADH)，生成的还原型辅酶 I (NADH) 在电子耦合试剂 1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate) 的作用下将 WST-8 还原成橙黄色的甲臜 (Formazam)，甲臜 (Formazam) 在 450 nm 处有最大吸收峰，体系中生成甲臜 (Formazam) 的量与氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 和还原型辅酶 I (NADH) 总量呈线性关系。
2. 检测还原型辅酶 I (NADH) 的量：样本经过 60°C 加热 30 min 预处理后，体系中的 NAD<sup>+</sup> 将分解只保留 NADH，NADH 将 WST-8 还原成橙黄色的甲臜 (Formazam)，通过比色法确定甲臜 (Formazam) 生成量来确定样品中 NADH 的含量。
3. 检测氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 含量及氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 与还原型辅酶 I (NADH) 比值：根据前两步检测得出样本中氧化型辅酶 II (NAD<sup>+</sup>) 含量及氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 与还原型辅酶 I (NADH) 比值。



II (NAD<sup>+</sup>) 含量及氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>) 与还原型辅酶 I (NADH) 比值。

WST-8 法检测 NAD<sup>+</sup>/NADH 总量原理图

#### 保存条件

-20°C 保存，有效期一年。

避光保存。

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°C 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<sup>+</sup>/NADH 提取液比较粘稠，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. NAD<sup>+</sup> 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。
7. 本产品仅限于专业人员的科学研究所用，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。



默科南京

Hotline: 025-69867707

8. 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  $\mu$ L 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<sup>+</sup>/NADH 提取液将 1 mM NADH 梯度稀释为 0  $\mu$ M、0.25  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、1  $\mu$ M、2  $\mu$ M、4  $\mu$ M、6  $\mu$ M、8  $\mu$ M、10  $\mu$ M 几个浓度, 对于 96 孔板每孔加入 20  $\mu$ L 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  $\mu$ M 为空白对照, 仅含 NAD<sup>+</sup>/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  $\mu$ L 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°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  $1 \times 10^6$  个细胞 (6 孔板单孔长满细胞量), 吸净培养液, 加入预冷 200  $\mu$ L NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液, 轻轻吹打使细胞裂解。  
悬浮细胞, 取  $1 \times 10^6$  个细胞, 600 g 离心 5 min, 吸净培养液, 加入预冷 200  $\mu$ L NAD<sup>+</sup>/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°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  $\mu$ L NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液在室温或冰上进行匀浆。  
(2) 4°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<sup>+</sup>/NADH 总量检测: 吸取 20  $\mu$ L 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<sup>+</sup>、NADH 含量或 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值检测: 吸取 50  $\mu$ L-100  $\mu$ L 待测样品至离心管中, 60°C 水浴或金属浴加热 30 min 使 NAD<sup>+</sup>充分分解。

- (2) 参考下表使用 96 孔板设置反应体系。

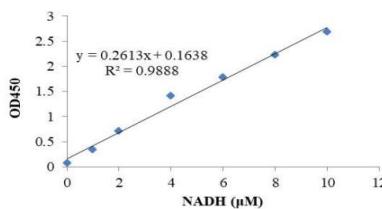
	空白对照	标准品	样品
待测样品	/	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
NAD <sup>+</sup> /NADH 提取液	20 $\mu$ L	/	/
乙醇脱氢酶工作液	90 $\mu$ L	90 $\mu$ L	90 $\mu$ L

- (3) 7°C 避光孵育 10 min。孵育的目的是将样品中的 NAD<sup>+</sup>还原 NADH。  
(4) 混匀显色液, 每孔加 10  $\mu$ L 显色液并混匀, 37°C 避光孵育 30 min。加入显色液后反应即开始, 橙黄色甲臜 (Formazam) 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<sup>+</sup>和 NADH 总量过高超出标准曲线范围, 可用 NAD<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>和 NADH 总浓度或 NADH 浓度。其中未经过 60°C 水浴或金属浴加热处理组, 计算得到 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总浓度(NAD<sup>+</sup> + NADH), 经过 60°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<sup>+</sup>、NADH 含量和 NAD<sup>+</sup>/NADH 总量(NAD<sup>+</sup> + NADH)。

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

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

**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<sup>+</sup>、NADH 含量和 NAD<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>、NADH 含量或 NAD<sup>+</sup>/NADH 总量。