

NAD/NADH Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence)

NAD/NADH 比率荧光检测试剂盒（红色荧光）

产品信息

产品名称	产品编号	规格
NAD/NADH Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence)	50130ES72	250 T
NAD/NADH 比率荧光检测试剂盒（红色荧光）		

产品描述

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD，辅酶I）是细胞中常见的重要辅因子，通过电子交换参与各种代谢反应。NADH（还原性辅酶I）是NAD的还原态。在氧化还原反应中，NADH作为氢和电子的供体，NAD作为氢和电子的受体，参与多种生理过程。NAD/NADH比率可以反应细胞中氧化还原状态。

该试剂盒适用于测定NAD和NADH，背景低，灵敏度高。NADH可以将探针还原为高荧光产物，其信号可以通过荧光酶标仪在Ex/Em = 540/590 nm或在比色测定(OD = 576 nm)中定量。

产品组分

组分编号	组分名称	组分规格	储存条件
50130-A	NAD/NADH Recycling Enzyme Mix	2 vials	-20°C
50130-B	NADH Sensor Buffer	20 mL×1	-20°C
50130-C	NADH Standard	1 vial (142 µg)	-20°C
50130-D	NADH Extraction Solution	10 mL×1	-20°C
50130-E	NAD Extraction Solution	10 mL×1	-20°C
50130-F	NAD/NADH Control Solution	10 mL×1	-20°C
50130-G	NAD/NADH Lysis Buffer	10 mL×1	-20°C

运输和保存方法

冰袋运输。避光保存于-20°C，有效期1年。

注意事项

- 1 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 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 粉末溶解前请先短暂离心，以保证产品全在管底。
- 4 请勿吸入、吞咽或者直接接触皮肤和眼睛。
- 5 本产品仅用于科研用途。

实验过程

1 试剂准备

- ① **NADH 标准品母液(1 mM)**: 将200 µL PBS (pH 7.4)加入NADH Standard (C组分)中制备1 mM NADH标准品母液，用

时置于冰上，未用完的分装-20°C 保存，避免反复冻融。

② **NADH 梯度标准液(0-10 μM)**: 将 970 μL PBS (pH 7.4)加入到 30 μL NADH 标准母液(1 mM)中制备 30 μM NADH 标准液，然后取 200 μL 的 30 μM NADH 标准液按照 1: 3 的比例用 PBS (pH 7.4)稀释成 NADH 梯度标准液(10 μM, 3.33 μM, 1.11 μM, 0.37 μM, 0.123 μM, 0.0411 μM)。

【注】: 稀释后的 NADH 标准液不稳定，应该配置后 4 h 内使用。

③ **NAD/NADH 反应液**: 向每瓶 NAD/NADH Recycling Enzyme Mix (组分 A) 中加入 10 mL NADH Sensor Buffer (B 组分)，混匀。

【注】: 相当于 96 孔板的 125 次测试的检测用量。NAD/NADH 反应液不稳定，注意避光并尽快使用，未用完的分装-20°C 保存。

④ **NAD/NADH Lysis Buffer (组分 G)**: 用前恢复至室温。

2 样本制备

2.1 细胞样本: 收集 $0.5-1 \times 10^7$ 个细胞，预冷 PBS 润洗后，加入 100 μL NAD/NADH Lysis Buffer (组分 G)，37°C 孵育 15 min，1500 rpm 室温离心 5 min，取上清检测。

2.2 组织样本: 取 20 mg 组织样本，预冷 PBS 润洗后，加入 400 μL NAD/NADH Lysis Buffer (组分 G)，室温匀浆，2500 rpm 室温离心 5 -10 min，取上清检测。

2.3 细菌样本: 4°C 10,000 g 离心 15 min 收集细菌，每 10^7 个细菌加入 1 mL NAD/NADH Lysis Buffer (组分 G)，室温孵育 15 min，2500 rpm 室温离心 5 -10 min，取上清检测。

2.4 植物样本: 取 200 mg 叶片，加入 1 mL NAD/NADH Lysis Buffer (组分 G)，室温匀浆，2500 rpm 室温离心 5 -10 min，取上清检测。

【注】: 建议使用新鲜样本，如果无法及时进行检测，样本建议存于-80 °C，检测时冰上解冻，但是检测的荧光值可能会降低。不要使用 RIPA 裂解液，因为 RIPA 裂解液会干扰检测。如果样本中 NADH 含量高，注意稀释样本。

3 检测过程

3.1 如下图，向 96 孔黑色平底孔板中加入 25 μL 的 NADH 标准液、待测样本或空白对照(PBS)。

Table 1. Layout of NADH standards, Blank Control and test samples in a solid black 96-well microplate.

BL	BL	TS (Total)	TS (Total)	TS (NADH)	TS (NADH)	TS (NAD)	TS (NAD)
NS1	NS1
NS2	NS2
NS3	NS3						
NS4	NS4						
NS5	NS5						
NS6	NS6						
NS7	NS7						

NS= NADH Standard, BL = Blank Control, TS (Total) = Test Sample treated with NAD/NADH Control Solution, TS (NADH) = test sample treated with NADH Extraction Solution, then neutralized by NAD Extraction, TS (NAD) = test sample treated with NAD Extraction Solution, then neutralized by NADH Extraction Solution

3.2 对于 NADH 的提取 TS (NADH): 向待测样本中加入 25 μL NADH Extraction Solution (组分 D)，室温孵育 10-15 min，再加入 25 μL NAD Extraction Solution (组分 E) 中和。

3.3 对于 NAD 的提取 TS (NAD): 向待测样本中加入 25 μL NAD Extraction Solution (组分 E)，室温孵育 10-15 min，再加入 25 μL NADH Extraction Solution (组分 D) 中和。

3.4 对于总 NAD 和 NADH 检测 TS (Total): 向待测样本中加入 25 μL NAD/NADH Control Solution (组分 F)，室温孵育 10-15 min，再加入 25 μL NAD/NADH Control Solution (组分 F)。

3.5 对于 NADH 标准液 NS1-7: 向 NADH 标准液中加入 25 μL NAD/NADH Control Solution (组分 F)，室温孵育 10-15 min，

再加入 25 μL NAD/NADH Control Solution (组分 F)。

Table 2 Reagent composition for each well

Well	Reagent	Treatment	Incubate at RT	Treatment	Total Volume
NS1-7	25 μL NADH Standard (0-10 μM NADH)	25 μL F		10-15 min	25 μL F
BL	25 μL PBS (pH 7.4)	25 μL F	25 μL F		75 μL
TS (Total)	25 μL Test sanmple	25 μL F	25 μL F		75 μL
TS (NADH)	25 μL Test sanmple	25 μL D	25 μL E		75 μL
TS (NAD)	25 μL Test sanmple	25 μL E	25 μL D		75 μL

3.6 每孔中加入 75 μL NAD/NADH 反应液 (测试总体积 150 μL)，混匀后，室温避光孵育 15 min-2 h。

3.7 荧光酶标仪下测量荧光读值($E_x/E_m=540/590$ nm); 也可以使用白色透明 96 孔板, 使用酶标仪在 $OD=576\pm 5\text{nm}$ 的波长下读数, 但灵敏度低于荧光检测。

【注】：高浓度的 NADH (终浓度 >300 μM) 会导致荧光读值下降, 因为 NADH sensor 被过度氧化, 生成非荧光产物。

数据分析

1 从空白标准孔获得的读数用作阴性对照。从其他标准的读数中减去该值, 以获得基线校正值, 荧光背景会随时间而增加, 因此标准品和测试样品的荧光读值计算前需减去空白孔的荧光强度值。然后, 通过绘制标准读数以获得标准曲线和方程。

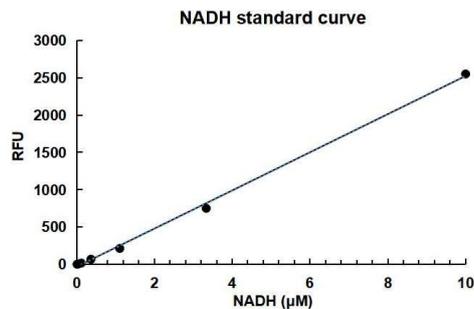


图 1 NADH 标准曲线

加入 75 μL NAD/NADH 反应液后室温避光孵育 30 min 后, 荧光酶标仪下测量荧光读值。

2 样本中 NAD 含量计算公式: $\text{NAD concentration} = (\text{B}/\text{V}) \times \text{D}$ 。B 代表根据标曲计算出的测试样本中 NAD 的含量(μM), V 代表测试样本体积(μL), D 代表测试样本稀释倍数。

3 样本中总 NAD 和 NADH 含量计算公式: $\text{Total concentration} = (\text{B}/\text{V}) \times \text{D}$ 。B 代表根据标曲计算出的测试样本中总的 NAD 和 NADH 的含量(μM), V 代表测试样本体积(μL), D 代表测试样本稀释倍数。

4 在健康的哺乳动物细胞中, NAD 比 NADH 多, 因此我们建议使用总 NAD 和 NADH 含量减去 NAD 来计算 NADH 的量。

