

Total NAD and NADH Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence)

总 NAD 和 NADH 荧光检测试剂盒 (红色荧光)

产品简介

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP⁺) 是细胞中发现的两种重要的辅助因子。NADH 是 NAD⁺ 的还原形式, NAD⁺ 是 NADH 的氧化形式。NAD 形成 NADP, 通过酯键将磷酸基团添加到腺苷核苷酸的 2' 位置。NADP 用于合成代谢生物反应, 例如脂肪酸和核酸合成, 其需要 NADPH 作为还原剂。在叶绿体中, NADP 是在光合作用的初步反应中重要的氧化剂, 光合作用产生的 NADPH 被用作光合作用卡尔文循环中生物合成反应的还原力。传统的 NAD/NADH 和 NADP/ NADPH 测定通过监测 340 nm 处的 NADH 或 NADPH 吸收的变化来完成, 但测定的短 UV 波长使得这些方法具有低灵敏度和高干扰, 且该分析是在紫外范围内进行的, 需要昂贵的石英微孔板。

翌圣生物提供的 Total NAD and NADH Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) 总 NAD 和 NADH 荧光检测试剂盒 (红色荧光) 为检测 NAD 和 NADH 提供了一种便捷的方法, 系统中的酶会在酶循环反应中识别 NAD 和 NADH, 不需要从样品混合物中纯化 NAD/NADH。此外, 该测定具有非常低的背景, 因为其在红色可见范围内运行, 这显著降低了生物样品引起的干扰。本试剂盒可以用于 96 或 384 微孔板分析, 其信号可通过荧光酶标仪 (Ex/Em=540/590 nm) 或吸光度酶标仪 (~576 nm) 轻松读取, 建议使用纯黑色的孔板。

产品信息

货号	60545ES74
规格	400 T

组分信息

组分编号	组分名称	规格	储存条件
60545-A	NAD/NADH Recycling Enzyme Mix	2 bottles (lyophilized powder)	-25~-15°C避光保存
60545-B	NADH Sensor Buffer	1 bottle(20 mL)	-25~-15°C避光保存
60545-C	NADH Standard (FW: 709)	1 vial (142 µg)	-25~-15°C避光保存

储存条件

-25~-15°C避光保存, 有效期 12 个月。

使用说明

1. 溶液制备

1.1 准备 NADH 标准品的储备溶液 (1 mM)

将 200 µL PBS 缓冲液加入到 NADH 标准品 (组分 C) 的小瓶中以制备 1 mM 的 NADH 储备溶液。【注意: 未使用的 NADH 储备溶液应分成单次使用的等分试样并储存在 -25~-15°C。】

1.2. 准备 NAD/NADH 反应混合物

将 10 mL 的 NADH Sensor Buffer (组分 B) 加入 NAD/NADH Recycling Enzyme Mix (组分 A) 的瓶中, 并充分混合。【注意: 配制的 NAD/NADH 反应混合物足以用于两个 96 孔或四个 384 孔板。未使用的 NADH 反应混合物应分成单次使用的等分试样并避光储存在 -25~-15°C。】

1.3 准备 NADH 标准品的系列稀释液 (0.0138 至 10 μM)

将 10 μL 的 NADH 储备溶液 (来自步骤 1.1) 加入到 990 μL PBS 缓冲液 (pH=7.4) 中以产生 10 μM 的 NADH 标准溶液 (NS7)。然后按照 1:2 比例依次稀释以获得其他浓度的 NADH 标准品 (NS6-NS1)。【注意: 稀释的 NADH 标准溶液不稳定, 应在 4 小时内使用。浓度信息为: NS6: 3.3333 μM; NS5: 1.1111 μM; NS4: 0.3704 μM; NS3: 0.1235 μM; NS2: 0.0412 μM; NS1: 0.0138 μM】。

2. 样品分析

2.1 根据表 1 和表 2 中提供的布局, 将 NADH 标准品和含 NAD/NADH 的测试样品的系列稀释液加入到固体黑色 96 孔微量培养板中。

2.2 将 50 μL 的 NAD/NADH 反应混合物 (来自步骤 1.2) 加入 NADH 标准品、空白对照和测试样品 (来自步骤 1.3) 的每个孔中, 使得总 NADH 测定体积为 100 μL/孔。注意: 对于 384 孔板, 每孔加入 25 μL 样品和 25 μL 的 NADH 反应混合物, 总体积为 50 μL/孔。

2.3 将反应混合物在室温下孵育 15 分钟至 2 小时, 避光。

2.4 荧光酶标仪下测量荧光数值, Ex/Em=540/590 nm。【注: 也可测量 Ex/Em=530-570/590-600 nm 的荧光数值, 但 Ex/Em=540/590 nm 处最佳。也可将板的内容物转移到白色透明底板上, 用吸光度酶标仪在 576±5nm 波长下读数。与荧光读数相比, 吸收检测具有较低的灵敏度。】

表 1 实心黑色 96 孔微孔板中 NADH 标准品和测试样品的布局 [NS=NADH 标准品; BL=空白对照; TS=测试样品]

BL	BL	TS	TS
NS1	NS1
NS2	NS2
NS3	NS3		
NS4	NS4		
NS5	NS5		
NS6	NS6		
NS7	NS7		

注意: 将连续稀释的 NADH 标准品 (0.0138 至 10 μM) 加入 NS1 至 NS7 的孔中, 一式两份。高浓度的 NADH (例如, >100 μM, 最终浓度) 可能由于 NADH 传感器 (对非荧光产物) 的过度氧化而导致荧光信号降低。

表 2 每个孔的试剂组成

孔	容积	试剂
NS1-NS7	50 μL	连续稀释液 (0.0138 至 10 μM)
BL	50 μL	1X PBS
TS	50 μL	测试样品

3. 实验方案概述

3.1 在开始实验之前, 将所有试剂盒组件解冻至室温。

- 3.2 准备 NAD/NADH 反应混合物 (50 μ L)。
- 3.3 添加 NADH 标准品或测试样品 (50 μ L)。
- 3.4 在室温下孵育 15 分钟到 2 小时，避光。
- 3.5 监测 Ex/Em=540/590 nm 处的荧光强度。

4. 数据分析

空白孔中的荧光 (仅用 PBS 缓冲液) 用作对照, 从 NADH 反应的那些孔的值中减去该值, 绘制 NADH 标准曲线如图 1 所示。注意: 作图时每个数据点需减去空白孔的荧光强度值。

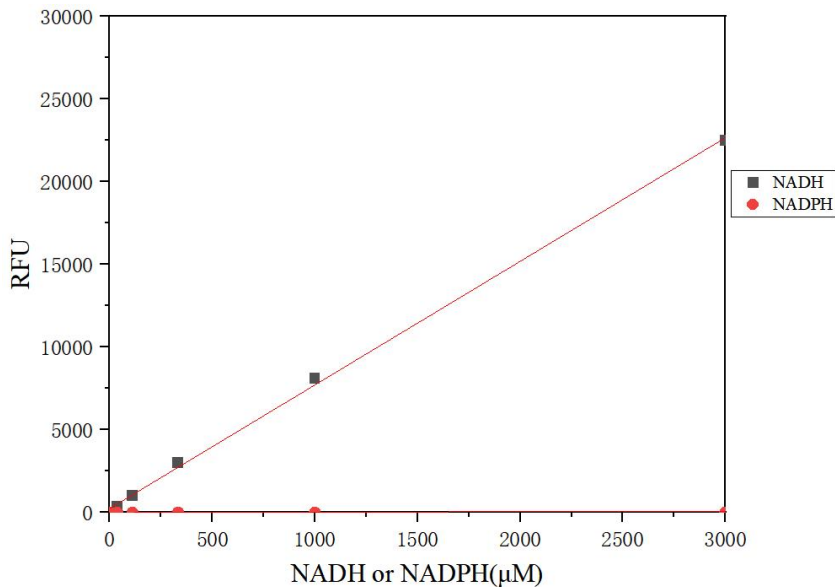


图 1 使用 NOVOSTar 酶标仪 (BMG Labtech) 在 96 孔黑色板中用总 NAD 和 NADH 荧光检测试剂盒测量 NADH[在孵育 1 h 时, 可以检测到低至 100 nM 的 NADH, 而 NADPH 没有响应]

5. 注意事项

1. 数据分析时注意空白孔中的荧光 (仅用 PBS 缓冲液) 用作对照, 作图时每个数据点需减去空白孔的荧光强度值。
2. 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。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅作科研用途!

产品名称	产品货号	产品规格	目录价 (元)
Fluorimetric Pyrophosphate Assay Kit 焦磷酸(PPi)荧光检测试剂盒	50115ES	200 T	4285
GSH/GSSG Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Green Fluorescence) GSH/GSSG 比例荧光检测试剂盒 (绿色荧光)	50120ES	200 T	5255
NAD/NADH Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) NAD/NADH 比率荧光检测试剂盒 (红色荧光)	50130ES	250 T	6655

NADP/NADPH 比率荧光检测试剂盒 (红色荧光)	50140ES	250 T	6655
Aldehyde Fluorimetric Detection Assay Kit (Blue Fluorescence) 醛类荧光检测试剂盒(蓝色荧光)	60540ES	200 T	2885
α -Ketoglutarate Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) α -酮戊二酸荧光检测试剂盒(红色荧光)	60541ES	200 T	5685
Glucose Oxidase Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) 葡萄糖氧化酶荧光检测试剂盒(红色荧 光)	60542ES	500 T	2885
NADH Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) NADH 荧光检 测试剂盒 (红色荧光)	60543ES	400 T	4285
NADPH Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) NADPH 荧光检测试剂盒 (红色荧光)	60544ES	400 T	4285
Total NAD and NADH Fluorimetric Detection Assay Kit (Red Fluorescence) 总 NAD 和 NADH 荧光 检测试剂盒 (红色荧光)	60545ES	400 T	5285