

概述

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)是参与糖酵解、电子转移系统和TCA循环等细胞主要代谢途径氧化还原反应的重要辅助因子。NAD以氧化型NAD⁺和还原型NADH的形式存在于细胞中。维持适当的NAD⁺和NADH水平对细胞功能至关重要。此外最近的研究表明NAD⁺水平的下降与衰老¹⁾相关，NAD⁺的量被认为是衰老相关研究的一个标志。

NAD/NADH检测试剂盒可以定量细胞中NAD⁺/NADH、NADH和NAD⁺的量，并测量它们的比值。细胞内NADH水平可以通过试剂盒内含的Extraction Buffer裂解细胞并在加热后选择性地定量检测。而细胞内的NAD⁺水平则可以通过总的NAD⁺/NADH总量减去NADH量计算得到。



图1. NAD/NADH试剂盒测定NAD的原理

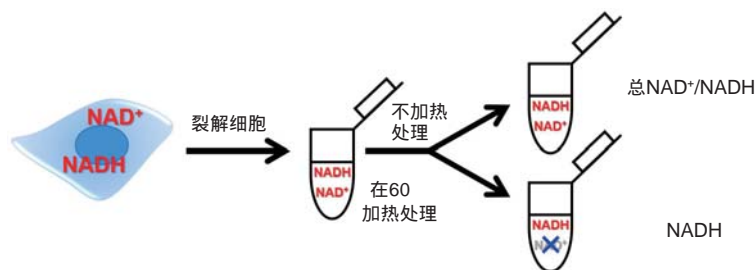


图2. 总NAD⁺/NADH、NADH和NAD⁺的检测方法

试剂盒内含

NAD/NADH Extraction Buffer	20 ml × 1
NAD/NADH Control Buffer	20 ml × 1
Standard Buffer	10 ml × 1
Assay Buffer	5.5 ml × 1
Dye Mixture (红盖)	550 μl × 1
Enzyme (绿盖)	× 1
Standard (蓝盖)	× 1
超滤管	× 12

储存条件

在0-5 °C 保存

所需的设备和材料

- 酶标仪 (450 nm滤光片)
- 96孔板
- 培养箱 (37 °C, 60 min)
- 20-200 μl多通道移液器
- 移液器 (100-1,000 μl, 20-200 μl, 2-20 μl)

注意事项

使用前请将试剂盒恢复至室温后使用。

由于运输中震动等原因，内容物可能粘附在管壁或管盖上，在开盖前请离心管子。

推荐每个样品做3个复孔以获得准确的数据。

由于在Working Solution加入孔中后酶会立刻反应，请使用多通道移液器以减少由于加样时间延迟而导致的实验误差。

请准备不同稀释比例的样品，并确定一个合适的稀释比例以使浓度范围在0-2 μmol/l。

溶液制备

配制Enzyme 储存液

在Enzyme管中加入35 μl PBS并吹打溶解。

因为内容物可能粘附在管壁或管盖上，在开盖前请先离心管子。

Enzyme储存液在实验中需要保持冰浴。

Enzyme储存液在0-5 $^{\circ}\text{C}$ 可以保存2个月。

配制Standard储存液 (10 mmol/l)

在Standard管中加入20 μl 超纯水，并吹打溶解。

因为内容物可能粘附在管壁或管盖上，在开盖前请先离心管子。

Standard储存液在实验中需要保持冰浴。

Standard储存液在0-5 $^{\circ}\text{C}$ 可以保存2个月。

配制Working Solution

(1) 将Dye Mixture储存液加入圆锥管中，并用Assay Buffer稀释。

(2) 将Enzyme加入到步骤 (1) 配制的溶液中。

	48孔板	96孔板
Dye Mixture	270 μl	540 μl
Assay Buffer	2.43 ml	4.86 ml
Enzyme 储存液	13.5 μl	27 μl

表1.Working Solution配制例

Working Solution对光敏感，请在使用前配制，并用铝箔包裹避光，请在当天内用完。

操作步骤

1. 样品制备

(1) 在1.5 ml微量管中制备细胞悬液 ($2.5 - 10 \times 10^5$ 个细胞)。

(2) 在300 $\times g$ 离心5 min，去除上清液。

(3) 在每管中加入500 μl PBS，吹打悬液，在300 $\times g$ 离心5 min，去除上清液。

(4) 在每管中加入300 μl NAD/NADH Extraction Buffer，吹打裂解细胞，并在12,000 $\times g$ 离心5 min。

(5) 将250 μl 上清液转移到MWCO 10K超滤管中，并在12,000 $\times g$ 离心10 min。

检测一次总NAD⁺/NADH和NADH至少需要100 μl 样品 (总共至少需要200 μl 样品)。

(6) 分别在2个1.5 ml微量管中加入100 μl 滤液，并将其分别作为总NAD⁺/NADH和NADH的样品。

(7) 将NADH样品溶液在60 $^{\circ}\text{C}$ 培养60 min。

这一步骤是为了分解样品溶液中的NAD⁺。

在检测前，将用于检测NAD⁺/NADH量的样品溶液一直置于冰浴中。

(8) 培养后，将NADH样品溶液放至室温。

(9) 在步骤6的总NAD⁺/NADH样品溶液和步骤8的NADH样品溶液中分别加入100 μl NAD/NADH Control Buffer后，用于检测。

检测时每孔需要50 μl 样品。

请准备不同稀释比例的样品，并确定一个合适的稀释比例以使浓度范围在0-2 $\mu\text{mol/l}$ 。用NAD/NADH Control Buffer稀释样品。

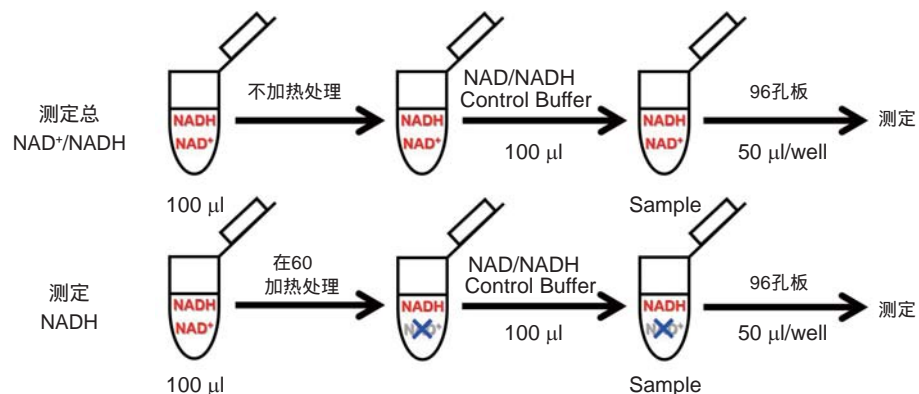


图3. 分别检测总NAD⁺/NADH和NADH的示意图

2. 配制标准液

- (1) 将2 μl 10 mmol/l的Standard储存液和198 μl 超纯水在微量管中混合，制备成100 $\mu\text{mol/l}$ 的标准液。
- (2) 将10 μl 100 $\mu\text{mol/l}$ 的标准液和490 μl Standard Buffer在微量管中混合制备成2 $\mu\text{mol/l}$ 的标准液。用Standard Buffer如下图稀释配制成系列浓度 (浓度分别为2 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 0.5 $\mu\text{mol/l}$, 0.25 $\mu\text{mol/l}$, 0.125 $\mu\text{mol/l}$, 0.0625 $\mu\text{mol/l}$, 0.0313 $\mu\text{mol/l}$ 和0 $\mu\text{mol/l}$) 的标准液。

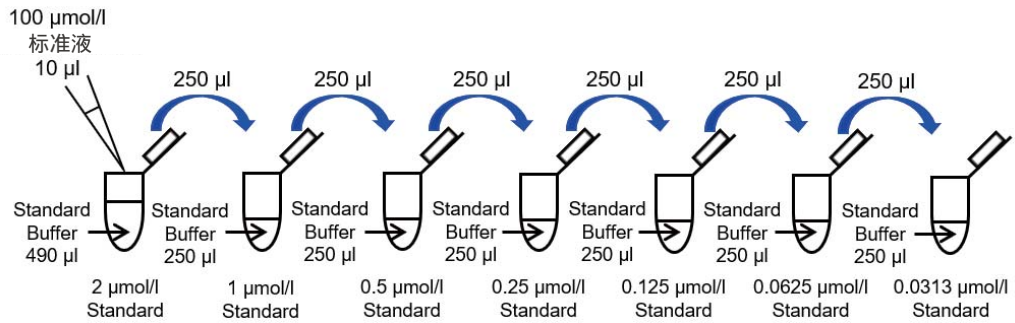


图4. 配制标准液

3. 检测

	1	2	3	4	5	6
A	0 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 1 (总NAD ⁺ /NADH)		
B	0.0313 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 1 (NADH)		
C	0.0625 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 2 (总NAD ⁺ /NADH)		
D	0.125 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 2 (NADH)		
E	0.25 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 3 (总NAD ⁺ /NADH)		
F	0.5 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 3 (NADH)		
G	1 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 4 (总NAD ⁺ /NADH)		
H	2 $\mu\text{mol/l}$ 标准液			样品 4 (NADH)		

图5. 96孔板排列示例 (n=3)

- (1) 按照图5，在每孔中分别加入50 μl 的标准液和样品溶液。
为了获得准确的数据，建议每个样品做3个复孔。
- (2) 在每孔中加入50 μl Working Solution。
由于在加入Working Solution后酶会立刻反应，请用多通道移液器以减少由于加液时间延迟而导致的实验误差。
- (3) 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养60 min。
培养时请密封培养板，以防止液体蒸发。
- (4) 用酶标仪在450 nm处检测吸光度。
- (5) 用标准曲线测定样品中总NAD⁺/NADH和NADH的量。
如果原样品在检测前已稀释，可用稀释倍率乘以检测的数值。
NAD⁺的量可用总NAD⁺/NADH的量 - NADH的量计算得到

$$\text{NAD}^+ = \text{总NAD}^+/\text{NADH} - \text{NADH}$$

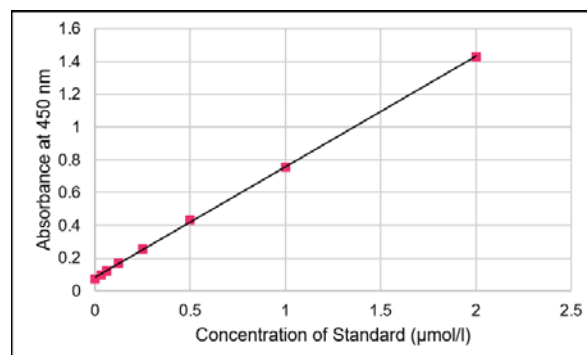


图6. 标准曲线

实验例

检测HeLa细胞中总NAD⁺/NADH, NAD⁺, NADH的量以及NAD⁺/NADH比值。

- (1) 在1.5 ml微量管中制备HeLa细胞悬液 (2.5 × 10⁵个细胞/管和5.0 × 10⁵个细胞/管)。
- (2) 在300 × g离心5 min后去除上清液。
- (3) 在每管中加入500 μl PBS, 在300 × g离心5 min后去除上清液。
- (4) 在每管中加入300 μl NAD/NADH Extraction Buffer, 吹打裂解细胞后, 在12,000 × g离心5 min。
- (5) 取250 μl上清液加入到MWCO 10K超滤管中, 在12,000 × g离心10 min。
- (6) 分别在2个1.5 ml微量管中加入100 μl滤液, 并将其分别作为总NAD⁺/NADH和NADH的样品。
总NAD⁺/NADH样品在检测前需放置在冰浴中。
- (7) 将NADH样品溶液在60 °C培养60 min, 培养后将样品溶液放至室温。
- (8) 在步骤6的总NAD⁺/NADH样品溶液和步骤7的NADH样品溶液中分别加入100 μl NAD/NADH Control Buffer后, 用于检测。
- (9) 按照标准液的配制方法配制系列标准液。
- (10) 在每孔中分别加入50 μl样品和50 μl标准液。
- (11) 在每孔中加入50 μl Working Solution。
- (12) 在37 °C培养箱中培养60 min。
- (13) 用酶标仪在450 nm处检测吸光度, 根据标准曲线计算样品中总NAD⁺/NADH和NADH的量。

$$\text{NAD}^+\text{的量} = \text{总NAD}^+\text{/NADH的量} - \text{NADH的量}$$

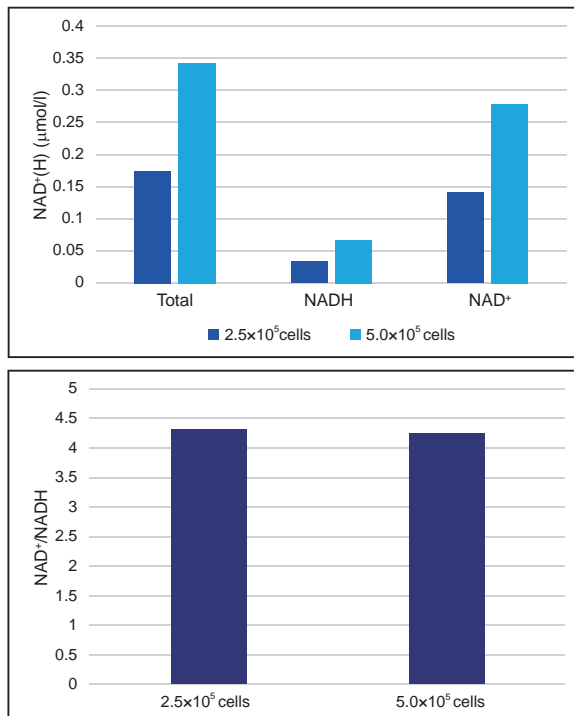


图7. HeLa细胞中总NAD⁺/NADH的量, NAD⁺的量, NADH的量以及NAD⁺/NADH比值。

参考文献

S.Imai, *et al.*, *Trends Cell Biol.*, **2014**, *24*, 464.

DOJINDO 东仁化学科技(上海)有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编：200030

邮编：100029

电话：400-823-9388

电话：010-8225-1765

2018年10月