

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## **NADP<sup>+</sup>/NADPH 测定试剂盒(WST-8 法)**

### **NADP<sup>+</sup>/NADPH Assay Kit (WST-8 Method)**

产品货号: BC00030

产品规格: 100T

**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:**

✉ 邮箱 (销售)      [order@enkilife.cn](mailto:order@enkilife.cn)

✉ 邮箱 (技术支持)    [tech@enkilife.cn](mailto:tech@enkilife.cn)

☎ 公司电话          027-87002838

🌐 网址                [www.enkilife.cn](http://www.enkilife.cn)



订阅微信公众号  
获取更多技术  
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

### 基本信息

|         |                                      |
|---------|--------------------------------------|
| 产品中文名称  | NADP+/NADPH 测定试剂盒(WST-8 法)           |
| 产品英文名称  | NADP+/NADPH Assay Kit (WST-8 Method) |
| 检测方法    | Colorimetric                         |
| 样品类型    | 组织、细胞                                |
| 检测类型    | Quantitative                         |
| 检测仪器及波长 | 酶标仪 (450 nm)                         |
| 检测范围    | 0.25-8μM                             |
| 灵敏度     | 0.02μM                               |

### 产品简介

本试剂盒是一种基于 WST-8 的显色反应,通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中 NAD<sup>+</sup> (氧化型辅酶 I)和 NADH (还原型辅酶 I)各自的量、比值和总量的检测试剂盒。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。例如 Sirtuins 家族的 Sirt1 等去乙酰化酶就需要以 NAD<sup>+</sup>作为底物进行去乙酰化反应来调控蛋白的乙酰化水平从而参与细胞的生命活动过程。NAD<sup>+</sup>在细胞和体内发挥着重要的功能, 其合成和降解及其产物参与细胞凋亡、代谢调控和基因表达的调控等, 并且 NAD<sup>+</sup>的减少是细胞死亡的主要因素之一。NAD<sup>+</sup>在调节细胞氧化还原状态方面的重要性以及调控信号通路及转录方面的功能, 使得 NAD<sup>+</sup>及其合成和消耗的酶成为多种疾病的潜在药物靶点。

### 产品特点

★ WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品, 和 MTT 或其他 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。首先, MTT 被一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的, 需要有特定的溶解液来溶解; 而 WST-8 和 XTT、MTS 产生的 formazan 都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。其次, WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。再次, WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定, 使实验结果更加稳定。

★ WST-8 和 MTT、XTT 等相比, 线性范围更宽, 灵敏度更高。

★ WST-8 和 WST-1 相比, 检测灵敏度更高, 更易溶解, 并且更加稳定。

★ 本试剂盒使用便捷, 灵敏度高, 线性范围宽。可以检测含量低至 0.25μM 的 NAD<sup>+</sup>或 NADP,

在 0.25μM 至 10μM 之间呈现良好的线性关系。使用细胞、组织等的裂解液即可进行检测，无需分离纯化细胞、组织或其它样品中的 NAD<sup>+</sup>和 NADH，并且能特异性检测 NAD<sup>+</sup>和 NADH，而不检测 NADP<sup>+</sup>和 NADPH。

检测原理

NAD<sup>+</sup>/NADH 以及的传统检测方法是检测 NADH 在 340nm 处吸收波长的变化，该方法灵敏度较低并易受样品中有类似紫外吸收物质的干扰，并且在紫外检测过程中通常需要加大检测样品量以弥补 NADH 在 340nm 处吸光度过小的不足，因此该传统检测方法具有很大的局限性。本试剂盒可检测样品中 NAD<sup>+</sup>、NADH 的含量以及它们的比值，具体原理如下：

- a. 测定 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量：乙醇(Ethanol)在乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)的作用下氧化生成乙醛(Acetaldehyde)，在这一反应过程中 NAD<sup>+</sup>被还原为 NADH;生成的 NADH 在电子耦合试剂 1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate)的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan, 在 450nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量呈比例关系。
- b. 单独测定 NADH 的量: 60℃ 水浴加热 30 分钟后, 样品中 NAD<sup>+</sup>会分解而只保留 NADH。NADH 将 WST-8 还原成 formazan，通过比色法确定反应生成的 formazan 的量，最终可以确定样品中 NADH 的量。
- c. 测定 NAD<sup>+</sup>以及 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值：根据前两步检测获得的 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量以及 NADH 的量，即可计算得到样品中 NAD<sup>+</sup>的量以及 NAD<sup>+</sup>/NADH 的比值。

产品组分

| 编号  | 产品名称                      | 包装规格 (100T) | 保存方式                                         |
|-----|---------------------------|-------------|----------------------------------------------|
| 试剂一 | 乙醇脱氢酶                     | 220μl       | -20℃，避免反复冻融。                                 |
| 试剂二 | 显色液                       | 1.1ml       | -20℃，须避光保存；避免反复冻融。                           |
| 试剂三 | NADH                      | 5mg         | -20℃，须避光保存；NADH 配制成溶液后，须适当分装后-80℃ 保存；避免反复冻融。 |
| 试剂四 | NADH 配制液                  | 0.8ml       | -20℃，避免反复冻融。                                 |
| 试剂五 | NAD <sup>+</sup> /NADH 提取 | 50ml        | -20℃，避免反复冻融。                                 |
| 试剂六 | 反应缓冲液                     | 12ml        | -20℃，避免反复冻融。                                 |
| 耗材一 | 96 孔酶标板                   | 1 板         | RT                                           |

|     |        |     |    |
|-----|--------|-----|----|
| 耗材二 | 96 孔覆膜 | 2 张 | RT |
|-----|--------|-----|----|

## 保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。

## 实验前准备

### • 样品处理

1. 细胞样品的准备：对于贴壁细胞，约  $1 \times 10^6$  个细胞(大约相当于 6 孔板一个孔长满的细胞数量)，吸净培养液，用移液器加入 200 $\mu$ l 冰浴预冷的 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解；对于悬浮细胞，收集约  $1 \times 10^6$  个细胞，600g 离心 5 分钟，吸净培养液，用移液器加入 200 $\mu$ l 冰浴预冷的 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解。随后 12,000g，4℃ 离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品，冰浴存放备用。
2. 组织样品的准备：冰浴预冷的 PBS 洗涤组织后，称取约 10-30mg 的组织样品，用剪刀剪碎，置于匀浆器中，加入 400 $\mu$ l 冰浴预冷的 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液，在冰上或室温进行匀浆。随后 12,000g，4℃ 离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品，冰浴存放备用。

### • 试剂盒的准备工作

1. NADH 标准品的配制：吸取 655 $\mu$ l NADH 配制液，充分溶解本试剂盒提供的 5mg NADH 后即得到 10mM NADH 标准品。10mM NADH 标准品请适当分装后-80℃ 避光保存。
2. NADH 标准曲线的设置：将 10mM 的 NADH 标准品用 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液稀释成适当的浓度梯度，如初次检测可以设置 0、0.625、1.25、2.5、5、10 $\mu$ M 这几个浓度，检测时 96 孔板中每孔加入 20 $\mu$ l 的标准品，相当于每孔为 0、12.5、25、50、100、200pmol 的 NADH。如有必要，在后续的实验中可以根据样品中的 NADH 含量对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为 0 $\mu$ M 的点为空白对照点，仅含 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液。  
注意：由于 NADH 很不稳定，故配制后需尽快使用。
3. 乙醇脱氢酶工作液的配制：将乙醇脱氢酶用反应缓冲液稀释 45 倍，例如 2 $\mu$ l 乙醇脱氢

酶加入到 88μl 的反应缓冲液中，即可获得 90μl 的乙醇脱氢酶工作液。每个标准品或样品的检测需要使用 90μl 的乙醇脱氢酶工作液，请根据所需检测的标准品和样品的数量，配制适量的乙醇脱氢酶工作液，并注意现配现用。

操作流程

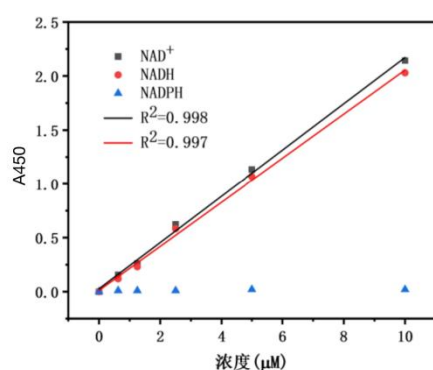
- 1. 样品中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量的测定：吸取 20μl 待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的总量过高，超出标准曲线的范围，则需要用 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；总量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。
- 2. 样品中 NAD<sup>+</sup>、NADH 的含量或者 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值的测定：吸取 50-100μl 待测样品于离心管中，60℃ 水浴或 PCR 仪上加热 30 分钟以分解 NAD<sup>+</sup>。如果加热后产生不溶物，则需 10,000g，室温或 4℃ 离心 5 分钟，吸取 20μl 上清液作为待测样品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 NAD<sup>+</sup>或 NADH 的含量过高，超出标准曲线的范围，则需要用 NAD<sup>+</sup>/NADH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；含量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。
- 3. 请参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、标准品孔和样品孔。加入乙醇脱氢酶工作液后充分混匀。

|                            | 空白对照孔(blank) | 标准品孔(standard) | 样品孔(sample) |
|----------------------------|--------------|----------------|-------------|
| 待测样品                       | —            | 20 μl          | 20 μl       |
| NAD <sup>+</sup> /NADH 提取液 | 20 μl        | —              | —           |
| 乙醇脱氢酶工作液                   | 90 μl        | 90 μl          | 90 μl       |

- 4. 37℃ 避光孵育 10 分钟。说明：此孵育步骤的目的是将样品中的 NAD<sup>+</sup>转化为 NADH；在加入乙醇脱氢酶工作液的过程中须轻柔操作，以免产生气泡。若不慎出现气泡，可使用细小的吸头或针头戳破。
- 5. 适当混匀显色液，然后每孔加入 10μl 显色液，混匀，37℃ 避光孵育 30 分钟，此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm 处的吸光度。如果显色较浅，也可以适当延长孵育时间至 45-60 分钟。

## 结果计算

1. 计算标准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. 以 NADH 的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。NADH 标准品的检测效果请参考下图。



上图显示本试剂盒可以很好地检测出 NAD<sup>+</sup>和 NADH 的含量，并且不会受 NADPH 的干扰。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

3. 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总浓度或者 NADH 的浓度。未 60°C 加热处理时，检测得到的是样品中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总量的浓度(NADtotal)；60°C 加热处理后，检测得到的是样品中 NADH 的浓度。根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出 NAD<sup>+</sup>、NADH、NADtotal 的量。
4. 根据如下计算公式，计算样品中 NAD<sup>+</sup>的量以及 NAD<sup>+</sup>/NADH 的比值。此时可以把 NAD<sup>+</sup>和 NADH 总量或各自的含量用单位细胞数量或单位组织重量中的含量来表示。

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

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

## 注意事项

1. 本试剂盒中的所有试剂均需要冷冻保存，请严格按照保存条件进行保存。如果不是一次

用完，为避免反复冻融导致产品失效，请适当分装后保存。

2. NADH 不太稳定，取出 NADH 后请尽快使用。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. 由于  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  提取液比较粘稠，以该提取液作为稀释液时，无论对标准品还是样品进行稀释，在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. 在样品加样和混匀过程中，须尽量避免产生气泡，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，每次检测都需要设置标准曲线。
6. 如果样品溶液中  $\text{NAD}^+$  和 NADH 浓度过高或过低，不在试剂盒的线性检测范围内时，可适当调整样品或者提取液的用量。
7. 由于  $\text{NAD}^+$  和 NADH 很不稳定，在冻存过程中较易降解，所以宜尽量使用新鲜样品进行检测。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。