NAD/NADH检测试剂盒 (100T)

一般说明

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)是一种参与多种氧化还原反应的酶辅因子。NAD作为电子载体，在氧化(NAD)和还原(NADH)形式之间循环。NAD除了在氧化还原反应中发挥作用外，在ADP(二磷酸腺苷)-核糖基化反应和作为去乙酰化酶的底物中也发挥着关键作用，NAD/NADH检测试剂盒为敏感检测细胞内核苷酸、NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和NADH及它们的比值提供了一种方便的工具，最低可检测0.2μM的样品。

适用范围:

直接检测细胞或者组织中的NAD/NADH浓度和比值。

试剂盒组成与保存

缓冲液: 10mL　　乳酸溶液: 1.5mL　　MTT溶液: 1.5 mL　　NAD标准品: 0.5 mL　　酶A:120 μL　　酶B:120 μL

储存：所有试剂在 -20°C保存。

检测步骤

1. NAD提取液和NADH提取液配制

NAD提取液：取1.66毫升的浓盐酸用纯水稀释成200毫升。

NADH提取液:取0.8克氢氧化钠用纯水稀释成200毫升。

提取液均保存在-20°C。

2. 样品预处理：称取20mg的组织，用冷的PBS溶液清洗。对于细胞样品，用冷却的PBS溶液清洗并离心收集～10^5个细胞。在离心管内用100μL NAD提取液或用100μL NADH提取液匀浆样品。匀浆后60°C加热5分钟，再添加20 μL缓冲液和100 μL对应提取液来中和提取物（如提取NAD，就使用NADH提取液中和；提取NADH，则使用NAD提取液），短暂振荡并以14,000的转速离心样品5分钟，使用上清液作NAD/NADH的检测。样本做一式两份。

3. 标准品制备: 将10 μL标准品和990 μL蒸馏水混合成10 μM NAD混合液，稀释标准如下：

标号	混合液 + 纯水	(μM)
1	100μL + 0μL	10
2	60μL + 40μL	6
3	30μL + 70μL	3
8	0μL + 100μL	0

使用透明平底96孔板，取40 μL配好的不同浓度的标准混合液分别放入孔内。再取40μL样品放入不同的孔内。

4. 反应试剂配制: 按60μL缓冲液, 1μL 酶A, 1μL 酶B, 14μL乳酸试剂和14 μL MTT的比例配置足量反应试剂。现配现用。

5. 反应: 每孔迅速添加80μL反应试剂，轻敲孔板混合。在室温下读取565nm处0分钟(OD_0)和15分钟(OD_{15})的光密度。

6. 浓度计算：分别从标准品和样品的OD_{15}中减去各自的OD_0，再绘制标准曲线，从而计算样品中NAD/NADH 的浓度。

注意：如果样品测值大于 10μM，就需要用蒸馏水稀释样品再次检测，结果乘以稀释系数 N。由于在相应浓度范围内，NAD 和 NADH 的标准曲线是一致的，但由于 NADH 标准液不稳定，测试盒仅提供 NAD 标准品。