

中文说明书

NAD/NADH-Glo™ Assay

适用产品目录号：G9071 和 G9072



NAD/NADH-Glo™ Assay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols/ 获得，请访问该网址以确认您正在使用的是最新版本的产品说明书。
如果您使用本产品时遇到任何问题，请发送电子邮件至：chinatechserv@promega.com

1. 产品描述	2
2. 产品组分和储存条件	6
3. NAD/NADH-Glo™ Assay 操作步骤	7
3. A. 制备荧光素检测试剂	7
3. B. 制备 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂	7
3. C. 操作步骤	8
4. 注意事项	9
5. 分别测量 NAD ⁺ 或 NADH	10
5. A. 样品制备方法	10
5. B. 生成标准曲线	13
6. 确立细胞线性范围	14
7. 参考文献	14
8. 缓冲液和溶液的成分	15
9. 相关产品	16
10. 内容变更总结	18

1. 产品描述

NAD/NADH-Glo™ Assay^(a, b) 是一款生物发光检测试剂，能够检测氧化型和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（分别缩写为 NAD⁺ 和 NADH）的总量，并可确定它们在生物样品中的比值。NAD⁺ 和 NADH 是代谢、信号传导和表观遗传学等主要细胞过程中至关重要的分子，它们的含量是细胞健康的关键指标（1,2）。

NAD/NADH-Glo™ Assay 采用均质的、单一试剂添加的方法快速检测细胞和酶促反应中的 NAD⁺ 和 NADH，可适应高通量形式的抑制剂筛选。

NAD 循环酶可以将 NAD⁺ 转化为 NADH。在 NADH 存在时，还原酶将 proluciferin（还原酶底物）还原成萤光素。萤光素通过 Ultra-Glo™ 重组萤光素酶（rLuciferase）定量，反应产生的光信号与样品中 NAD⁺ 和 NADH 的量成正比（图 1）。NAD 循环酶和还原酶所驱动的 NAD⁺ 和 NADH 循环增加了检测的灵敏度和选择性，使得试剂盒只检测非磷酸化的 NAD⁺ 和 NADH，而不会检测磷酸化形式的 NADP⁺ 和 NADPH。

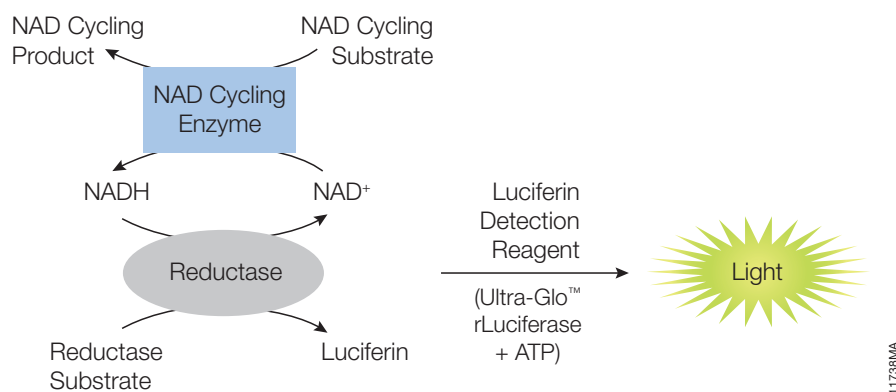


图 1. NAD/NADH-Glo™ Assay 技术原理示意图。 NAD 循环酶将 NAD⁺ 转化为 NADH。NADH 存在时，还原酶通过酶促反应将还原酶底物 proluciferin 还原成萤光素 (luciferin)。通过 Ultra-Glo™ 重组萤光素酶可以检测萤光素，而产生的光信号与样品中 NAD⁺ 和 NADH 的量成正比。

NAD 循环酶、还原酶和萤光素酶的反应是通过将等体积的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂加入含有 NAD⁺ 或 NADH 的样品中而被启动，检测试剂中包含 NAD 循环酶和底物、还原酶、还原酶底物和 Ultra-Glo™ 重组萤光素酶（图 2）。检测试剂中含有的去污剂可将细胞裂解，因而通过加入一种试剂即可检测多孔板中细胞内总 NAD⁺ 和 NADH 的含量。另外，我们还提供了可分别测量 NAD⁺ 和 NADH 以及计算 NAD⁺ 和 NADH 比率的操作步骤（第 5.A 节）。

由于偶联酶促反应的循环，在样品中加入 NAD/ NADH-Glo™ 检测试剂后光信号会持续增强（见第 6 节）。在该方法的线性范围内，发光信号与 NAD⁺ 和 NADH 的初始量成正比。该方法的线性范围为 10nM 至 400nM NAD⁺，且信背比（信号背景比，signal-to-background ratio）很高，并且对非磷酸化形式具有特异性（图 3）。该试剂盒与 96 孔板、384 孔板、低容量 384 孔板和 1536 孔板兼容，非常适合在酶促反应中或直接在高通量模式下监测细胞中小分子化合物对 NAD⁺ 和 NADH 水平的影响。

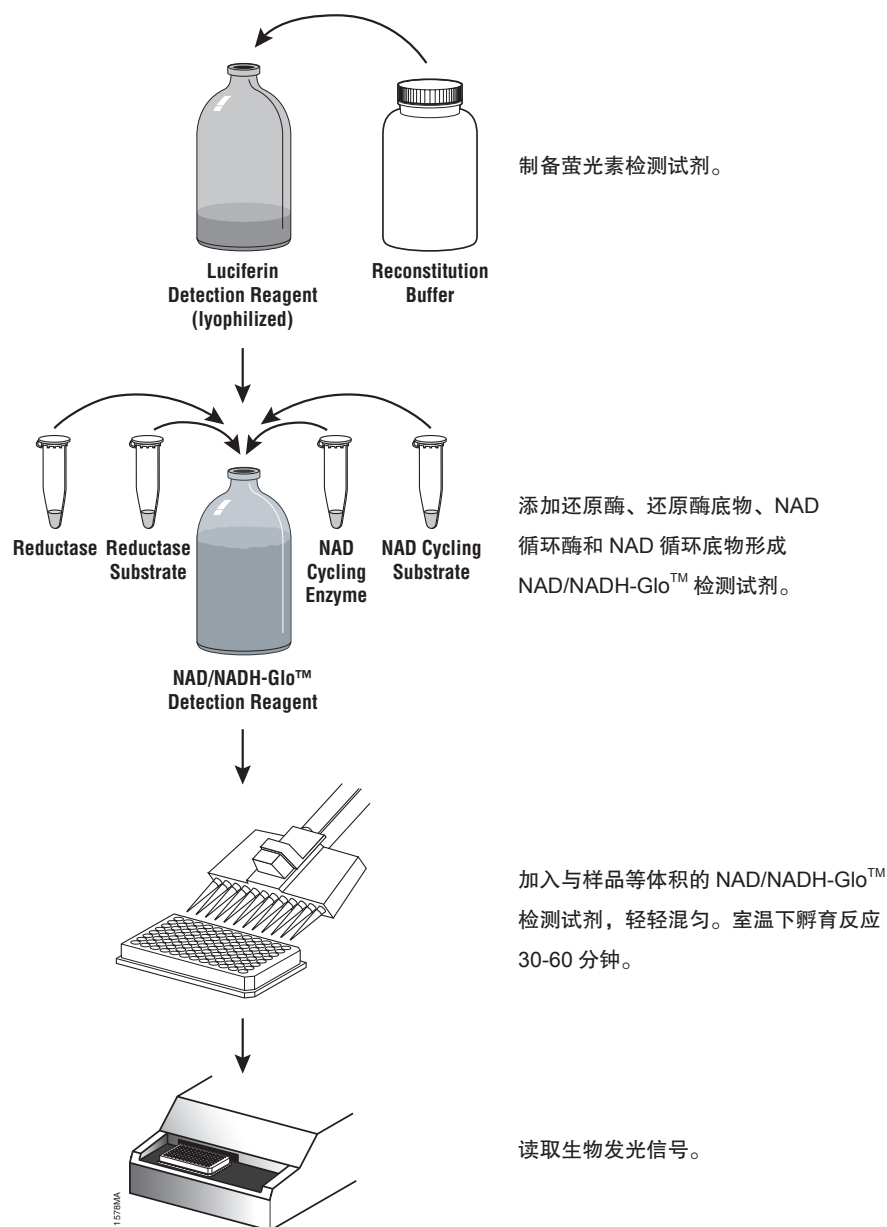


图 2.NAD/NADH-Glo™ Assay 操作步骤示意图。

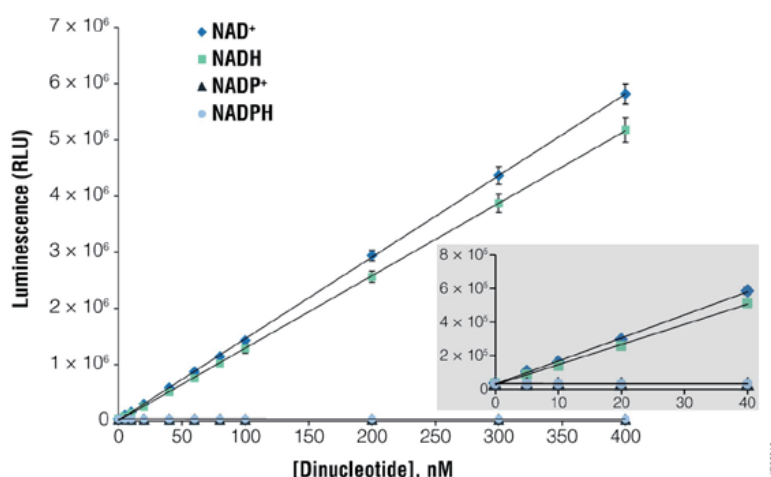


图 3. NAD/NADH-Glo™ Assay 的线性范围和特异性。根据第 3.C 节中所述的方法检测单独纯化过的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。用粉末（Sigma 目录号分别为 N6660、N9910、N8285 和 N8035）制备新鲜的 NADH、NADPH、NAD⁺ 和 NADP⁺ 储备液，并用磷酸盐缓冲盐水（PBS）稀释至指定浓度。在白色 96 孔检测板中，将 50μl 每个浓度的二核苷酸样品与 50μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂一起孵育，孵育 30 分钟后使用 GloMax® 96 微孔板发光检测仪检测发光信号。每个点代表以相对发光单位（RLU）测量的一式四份反应的平均发光值。其中误差线为 ±1 标准差。本实验的检测下限约为 1nM。生成该图的实验数据见表 1。

表 1 纯化的二核苷酸的滴定 (titration)

NAD ⁺			NADH	
二核苷酸浓度 (nM)	发光值 (RLU)	信背比 ¹ (Signal-to- Background Ratio)	发光值 (RLU)	信背比 ¹ (Signal-to- Background Ratio)
400	5,813,895	163.7	5,175,684	145.1
300	4,364,286	122.9	3,872,261	108.5
200	2,942,975	82.9	2,564,713	71.9
100	1,431,256	40.3	1,288,099	36.1
80	1,141,183	32.1	1,020,158	28.6
60	872,819	24.6	758,605	21.3
40	585,845	16.5	512,531	14.4
20	295,865	8.3	257,097	7.2
10	161,209	4.5	138,984	3.9
5	104,505	2.9	86,631	2.4
0	35,513	1.0	35,681	1.0

¹ 样品信号值除以 0nM 对照的信号值

NAD/NADH-Glo™ Assay 的优势包括:

高灵敏度: 可直接检测细胞孔中总 NAD⁺ 和 NADH 含量, 对细胞数量要求少, 无需样品制备。

一步法、均质检测: 只需在 96 孔或 384 孔细胞培养板中加入单一检测试剂, 即可直接检测总 NAD⁺ 和 NADH。另外还提供简单的细胞培养板内分别测定 NAD⁺ 和 NADH 的操作方案。

检测窗口宽: NAD/NADH-Glo™ Assay 可检测 10nM 至 400nM NAD⁺ 和 NADH。该试剂盒检测 100nM 的信号值高于背景值五倍以上, 检测窗口 (最大信背比) ≥100。

兼容自动化: 操作方案兼容自动化和高通量检测。反应体系可调, 支持 96、384 和 1536 孔板检测。

可靠性与可重复性: NAD/NADH-Glo™ Assay 在通常实验中的 Z' 因子值 >0.7。

基于发光的 NAD⁺ 和 NADH 检测: 避免了荧光检测方法中常见的试剂盒待测化合物的荧光干扰。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
NAD/NADH-Glo™ Assay	10ml	G9071

本系统包含的试剂足够在 96 孔板中进行 100 次反应 (100μl 样品 + 100μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂), 384 孔板中进行 400 次反应 (25μl 样品 + 25μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂) 或在低容量 384 孔板中进行 2000 次反应 (5μl 样品 + 5μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂)。只需保持样品与 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂的比例为 1:1, 即可根据微孔板样式改变检测体积。具体包括:

- 55μl Reductase
- 55μl Reductase Substrate
- 1 vial NAD Cycling Enzyme (lyophilized)
- 1.25ml NAD Cycling Substrate
- 1 vial Luciferin Detection Reagent (lyophilized)
- 10ml Reconstitution Buffer

产品	规格	目录号
NAD/NADH-Glo™ Assay	50ml	G9072

本系统包含的试剂足够在 96 孔板中进行 500 次反应 (100μl 样品 + 100μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂), 384 孔板中进行 2000 次反应 (25μl 样品 + 25μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂) 或在低容量 384 孔板中进行 10000 次反应 (5μl 样品 + 5μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂)。只需保持样品与 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂的比例为 1:1, 即可根据微孔板样式改变检测体积, 具体包括:

- 275μl Reductase
- 275μl Reductase Substrate
- 1 vial NAD Cycling Enzyme (lyophilized)
- 1.25ml NAD Cycling Substrate
- 1 vial Luciferin Detection Reagent (lyophilized)
- 50ml Reconstitution Buffer

储存条件: 所有组分均在 -65℃ 以下保存。或将还原酶底物在 -65℃ 以下保存, 其他组分在 -30℃ 至 -20℃ 保存。尽量减少所有试剂的反复冻融。

3.NAD/NADH-Glo™ Assay 操作步骤

3.A. 制备荧光素检测试剂

1. 融化 Reconstitution Buffer (重悬缓冲液), 使其与冻干的 Luciferin Detection Reagent (荧光素检测试剂) 都平衡至室温。
2. 将全部 Reconstitution Buffer 转移至装有冻干的 Luciferin Detection Reagent 的棕色瓶中。
3. 旋转或颠倒棕色瓶以便充分混匀得到均一溶液。请勿涡旋震荡。冻干的 Luciferin Detection Reagent 应该在不到 1 分钟的时间内快速溶解。

注意: 在制备 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂时, 已配好的荧光素检测试剂可在室温储存。如果不立即使用配好的荧光素检测试剂, 可将该试剂在室温 (约 22℃) 保存, 最长可保存 24 小时, 或者分装成单次使用的小份儿, 并储存在 4℃ (最长 1 周) 或 -20℃ (最长 3 个月), 试剂活性不改变。

3.B. 制备 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂

确定将要进行的 NAD/NADH-Glo™ 检测的次数, 并计算所需的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂的体积。向每份含有 NAD⁺ 或 NADH 的样品中加入等体积的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。我们建议额外准备一些试剂以弥补移液误差。不要储存未使用的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。

1. 将配好的荧光素检测试剂平衡至室温。
2. 使用之前, 在室温或冰上融化 Reductase (还原酶)、Reductase Substrate (还原酶底物) 和 NAD Cycling Substrate (NAD 循环底物)。将管子进行短暂离心, 使所含试剂沉至底部, 然后置于冰上储存。
3. 加入 275μl 水以复原 NAD Cycling Enzyme (NAD 循环酶)。轻轻旋动小瓶进行混合, 然后储存在冰上。
4. 根据表 2 所示, 按照每 1ml 配好的荧光素检测试剂所对应的其他试剂的体积, 加入相应量的 Reductase、Reductase Substrate、NAD Cycling Enzyme 和 NAD Cycling Substrate, 以制备所需量的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。

! 为获得最佳效果, 我们建议即将使用之前再制备 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。必要时, 制备完成的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂可以在室温下储存并在 6 小时内使用。

表 2 制备 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂

组分	体积
Reconstituted Luciferin Detection Reagent	1ml
Reductase	5μl
Reductase Substrate	5μl
NAD Cycling Enzyme	5μl
NAD Cycling Substrate	25μl

5. 轻轻颠倒混合五次。
6. 将未使用的 Reductase、NAD Cycling Enzyme 和 NAD Cycling Substrate 放回 -20℃ 储存。将未使用的 Reductase Substrate 放回 -65℃ 以下储存。不要储存未使用的 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。尽量减少所有试剂的反复冻融次数。

3.C. 操作步骤

对您所使用的特定的细胞系进行滴定，以确定与 NAD/NADH-Glo™ Assay 一起使用时的线性范围及最佳细胞数（参见第 6 节）。设置不含细胞的对照孔以检测背景发光值。

此方案介绍的是在 96 孔板中，50μl 样品和 50μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂的反应。反应体积可以变化，只要确保样品与 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂的比例为 1:1 即可。在本手册中样品指的是起始材料，例如组织培养细胞。

注意：避免样品中出现 DTT 和其他还原剂。还原剂会与还原酶底物发生反应，从而提高背景值。同时也要避免出现诸如 EDTA 之类的螯合物。

1. 将细胞接种到壁不透明的白色细胞培养板中，用目标化合物处理。每个孔的最终体积应为 50μl。
2. 如果处理过程中细胞在 37℃ 孵育，则检测前将培养板从培养箱中取出，并放置 5 分钟平衡至室温。

注意：试剂盒可以与大部分完全培养基兼容，因此无需移出培养基。如果需要，可以从每个孔中取出培养基，并用 50μl PBS 代替。

3. 在每个孔中加入 50μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。
4. 轻轻地摇晃几次培养板混匀并裂解细胞。
5. 在室温下孵育 30 至 60 分钟。

注意：光信号将随着时间持续增强。可以随着时间连续监测光输出值的变化，也可以在单个时间点测量发光。确保根据不同的应用选择最佳的孵育时间（参见第 6 节）。

6. 通过发光检测仪记录发光值。

4. 注意事项

微孔板与发光检测仪

使用与您的发光检测仪匹配的不透明的、白色且为 TC (组织培养) 处理过的无菌多孔板 (e.g., Corning® 96-well solid white flat-bottom polystyrene TC-treated microplates, Cat.# 3917, or Corning® 384-well low-flange white flat-bottom polystyrene TC-treated microplates, Cat.# 3570)。对于培养细胞样品而言, 可以使用白壁透明底的组织培养板 (e.g., Corning® 96-well flat clear-bottom white polystyrene TC-treated microplates, Cat.# 3903)。如果使用透明的细胞培养板, 则必须在测量发光值前, 将反应液转移至白色发光检测仪平板。光信号在黑色板中会减弱, 透明板会使孔与孔之间光的交叉干扰增强。所有可检测发光信号的标准的仪器均适用于本方法。仪器设置取决于发光检测仪制造商。每孔 0.25-1 秒的整合时间可作为参数设置时的指南。虽然相对光输出会因仪器不同而有所变化, 但这种变化不会影响检测性能。

温度

使用 NAD/NADH-Glo™ Assay 检测获得的发光信号的强度和稳定性取决于还原酶、NAD 循环酶和萤光素酶的反应速率。诸如温度等环境因素会影响反应速率和光输出强度。为确保结果的一致性, 使用前将 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂平衡至室温 (约 22°C), 并将检测板在室温下平衡 5 分钟, 然后再加入 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。平衡不充分会导致温度梯度, 进而使不同板之间出现差异。

化学环境

含有 NAD⁺ 或 NADH 样品的化学环境 (例如细胞类型、培养基和缓冲液) 会影响还原酶、NAD 循环酶和萤光素酶的酶促反应速率和光信号强度。一些培养基中包含的丙酮酸等成分会使酶促反应速率变慢。必要时, 可在添加 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂后延长孵育时间, 直到达到足够的灵敏度为止。我们建议对您所使用的特定细胞类型和培养基进行测试, 以确定适合您的应用的最优细胞数和孵育时间。此试剂盒与酚红兼容。

我们建议将含有 NAD⁺ 和 NADH 的样品 pH 值保持在 7-8。避免样品中出现螯合物 (如 EDTA)。萤光素酶反应需要二价镁离子, 二价镁离子包含在萤光素检测试剂中。另外, 也要避免样品中出现 DTT 和其他还原剂。还原剂会与还原酶底物发生反应, 从而提高背景值。

NAD/NADH-Glo™ 试剂盒可以与 DMSO 含量高达 10% 的样品兼容。

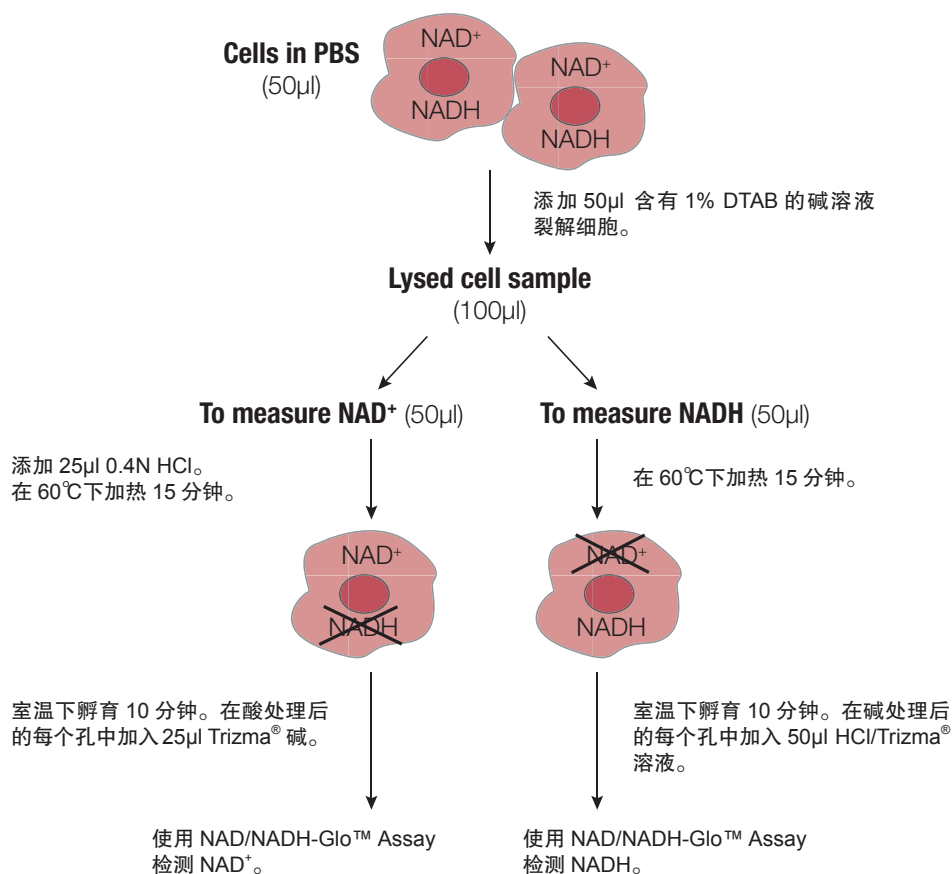
5. 分别测量 NAD^+ 或 NADH

5.A. 样品制备方法

分离氧化型 (NAD^+) 和还原型 (NADH) 利用的是在酸性和碱性 pH 条件下两种形式的稳定性差异。通常，在碱性溶液中加热会选择性地破坏氧化型，而还原型在酸性溶液中不稳定 (3)。通过酸性或碱性条件处理后即可分别测定细胞二核苷酸的水平。

使用 NADP/NADPH-Glo™ Assay 分别测量 NAD^+ 和 NADH 时，建议采用以下样品制备方案 (图 4)。使用此方案可以直接在 96 孔板的孔中处理细胞。我们建议最好在含有十二烷基三甲基溴化铵 (DTAB) 的碱溶液中裂解细胞，这种溶液可以在裂解细胞的同时保持二核苷酸的稳定性，然后再将样品分入不同孔进行酸处理和碱处理。这种方法的一个优势在于，可以通过板内处理从同一细胞样品测量 NAD^+ 和 NADH 。经过相同处理的样品还可以使用 NADP/NADPH-Glo™ 试剂盒 (目录号 G9081、G9082) 测量 NADP^+ 和 NADPH 。

样品制备完成后，所有中和后的样品具有相同的最终缓冲液配方，这有助于直接比较发光值。由于发光值和样品中 NAD^+ 或 NADH 的量呈正相关，将在酸溶液中加热样品得到的发光值除以碱溶液中加热样品得到的发光值即可计算出 NAD^+ 与 NADH 的比值。代表性数据如图 5 和表 3 所示。此外还可以生成一个标准曲线对 NAD^+ 和 NADH 水平进行定量 (参见第 5.B 节)。



11733MA

图 4. 分别测量 NAD^+ 和 NADH 的样品制备方案示意图。

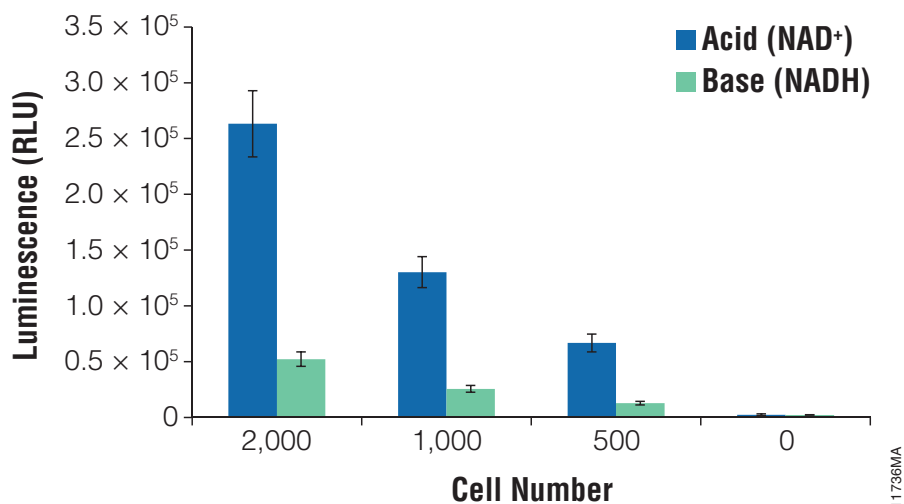


图 5. 从单个细胞样品中分别测量细胞内的 NAD⁺ 和 NADH。K562 细胞经离心处理后，在 PBS 中重悬至细胞密度为 4×10^5 细胞 /ml。用 PBS 连续两次稀释后，将 50 μ l 稀释后的细胞转移至白色 96 孔板的每个孔中。加入 50 μ l 含有 1% DTAB 的碳酸氢盐碱性缓冲液裂解细胞，并按照第 5.A 节所述进行操作。加热之前和之后都要称量 96 孔板的重量，以确定蒸发量。如果重量变化不超过 2%，说明蒸发导致的样品损耗很少。从每个中和后的样品中取 20 μ l 转移至 384 孔板，其中包含图中标示的细胞等同物数量，然后根据第 3.C 节的描述进行 NAD/NADH-Glo™ Assay 检测。将四重复反应得到的平均值绘制成图。其中误差线为 ± 1 标准差。

表 3 NAD⁺ 与 NADH 比值的计算。

	细胞数 ¹			
	2,000	1,000	500	0
酸处理后样品发光值 (NAD ⁺) (RLU)	263,217	130,205	66,700	2,278
碱处理后样品发光值 (NADH) (RLU)	52,215	25,604	12,766	2,135
NAD ⁺ 与 NADH 的比率	5.0	5.1	5.2	

¹20 μ l 中和后的样品连同 20 μ l NAD/NADH-Glo™ 检测试剂中含有的细胞等同物的数量。

用户需提供的材料

(溶液成分参见第 8 节)

- 磷酸盐缓冲液 PBS (例如 Sigma 目录号 D8537 或 Gibco 目录号 14190)

- 碱溶液: 碳酸氢盐碱性缓冲液或 0.2N NaOH

注意: 碳酸氢盐碱性缓冲液或 0.2N NaOH 这两种碱溶液均已在该方法中进行过测试, 发现具有相似性能。100 份样品需要 4.8ml 碱溶液 (可从两者中任选一种)。

- 0.4N HCl
- 含 1% DTAB 的碱溶液 (含 1% DTAB 的碳酸氢盐碱性缓冲液或含 1% DTAB 的 0.2N NaOH)
- 0.5M Trizma[®] 碱
- HCl/Trizma[®] 溶液

本方案用于在 96 孔白色发光检测仪平板中, 每孔含 50 μ l PBS 的细胞的检测。将每个孔中的细胞分成两份: 一份进行酸处理以确定 NAD⁺ 含量, 另一份进行碱处理以确定 NADH 含量 (见图 4)。进行细胞铺板时, 保留分装样品的孔。或者在进行样品分份儿时可以使用另一个多孔板。

1. 根据第 3.A 节所述制备荧光素检测试剂。
2. 在含有 50 μ l PBS 的每个细胞孔中加入 50 μ l 含 1% DTAB 的碱溶液。
3. 用微孔板振荡器短暂振荡多孔板, 以确保均质性和细胞裂解。
4. 从每份样品中取出 50 μ l 加入空白孔中进行酸处理。向这些样品中每孔加入 25 μ l 0.4N HCl; 这些孔中包含酸处理过的样品。原始样品孔是碱处理的样品, 不要加入 0.4N HCl。
5. 盖上多孔板的盖子, 将所有样品在 60 $^{\circ}$ C 下孵育 15 分钟。
6. 将多孔板在室温下平衡 10 分钟。
7. 在酸处理后细胞的每个孔中添加 25 μ l 0.5M Trizma[®] 碱进行中和。
8. 在包含碱处理样品的每个孔中添加 50 μ l HCl/Trizma[®] 溶液。

注意: 此时每个孔总体积为 100 μ l。为进行 NAD/NADH-Glo[™] 检测, 您可以在第 10 步中将 100 μ l NAD/NADH-Glo[™] 检测试剂直接加入每个孔中。或者, 您也可以将一部分样品移入另一个多孔板, 然后加入同等体积的 NAD/NADH-Glo[™] 检测试剂 (例如, 转移 20 μ l 样品至 384 孔板, 然后添加 20 μ l NAD/NADH-Glo[™] 检测试剂)。

9. 根据第 3.B 节所述制备 NAD/NADH-Glo[™] 检测试剂。
10. 在每个孔中添加同等体积的 NAD/NADH-Glo[™] 检测试剂 (例如 100 μ l)。
11. 轻轻摇晃多孔板使其充分混匀。
12. 在室温下孵育 30 至 60 分钟。
13. 使用发光检测仪记录发光值。

注意: 氧化型 (NAD⁺) 在碱溶液中加热会被选择性破坏, 而还原型 (NADH) 在酸溶液中不稳定。因此酸处理后样品的发光值与 NAD⁺ 的量成正比。碱处理后样品的发光值与 NADH 的量成正比。

5.B. 生成标准曲线

通过直接比较样品的发光值与纯化的 NAD^+ 或 NADH 产生的光信号，标准曲线使得发光值（以 RLU 为单位）与 NAD^+ 或 NADH 浓度的转换得以实现。制作标准曲线时，我们推荐使用纯化的 NAD^+ ，在 PBS 中制备 2mM NAD^+ 浓缩储备液。（如果使用 Sigma 目录号为 N8285 的产品，则可以直接在小瓶中制备储备液。）在检测即将开始前，在用于制备实验样品的相同缓冲液中稀释 2mM NAD^+ 储液，以制备所需浓度的标准样品，之所以这样做是因为 pH 值和其他缓冲成分会影响光信号（参见第 4 节）。如果使用第 5.A 节的样品制备方案制备实验样品，则使用等体积的 PBS、含 1% DTAB 的碱溶液、0.4N HCl 和 0.5M Trizma[®] 碱的溶液混合物稀释 NAD^+ 。将每个标准样品与实验样品在同一块板上进行检测。设置不含有 NAD^+ 的对照孔。

针对标准曲线上的每个点，计算平均发光值，然后减去空白反应（0nM NAD^+ 的反应）的平均发光值，得到净发光值。使用净发光值绘制标准曲线，并进行线性回归分析。将实验样品的净发光值与标准曲线中的数值进行对比，通过插值运算得到 NAD^+ 或 NADH 的量。

6. 确立细胞线性范围

在 NAD/NADH-Glo™ Assay 的线性范围内，发光值与细胞数量成正比。NAD/NADH-Glo™ Assay 与多种细胞类型和培养基兼容。但是绝对光信号强度和线性范围取决于具体细胞类型和培养基类型（图 6）。

我们建议对您的特定细胞类型和培养基进行测试，以确定适合您的应用的线性范围、最优细胞数量和最优孵育时间。

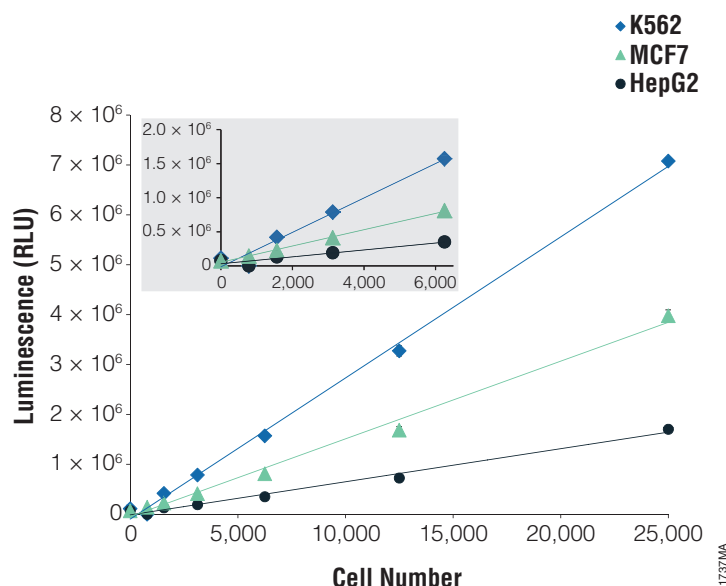


图 6. 光信号和细胞密度之间的线性关系。在 96 孔白板中对图中所示数量的细胞进行了测定，检测是在培养基 [含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 (用于 K562 细胞) 以及含 10% FBS 的 EMEM (用于 HEPG2 和 MCF7 细胞)] 中进行的。在每个稀释度下的 50μl 每种类型细胞中加入 50μl NAD/NADH-Glo™ 检测试剂。孵育 30 分钟后，使用 GloMax® 96 微孔板发光检测仪测量光信号。所得的数值代表四重复反应的平均值，其中误差线为 ± 1 标准差。CV 值 ≤ 5%。

由于偶联的酶促反应的循环，在样品中加入 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂后光信号将持续增强。可以随着时间监测光输出值的变化，或者也可以在单个时间点测量发光。最佳光信号通常会在 30 至 60 分钟内产生。线性范围随时间而变化，在后面的时间点，细胞数量多的样品可能会超出检测的线性范围。光输出仍然与样品中的 NAD⁺ 或 NADH 的量成比例，直到所有还原酶底物都被转换成萤光素为止。

注意：如果稳定的光信号是首选（例如，当批量处理多孔板时），则随时可以通过加入还原酶抑制剂甲萘醌来终止因加入 NAD/NADH-Glo™ 检测试剂导致的信号增强。加入反应体积 10% 的 2.75mM 甲萘醌（即 10μl 添加到 100μl 反应中），2.75mM 甲萘醌在 20% DMSO 中制备，其在反应中的终浓度为 0.25mM。

7. 参考文献

- Chiarugi, A. *et al.* (2012) The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer* **12**, 741–52.
- Houtkooper, R.H. *et al.* (2010) The secret life of NAD⁺: An old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine Reviews* **31**, 194–223.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V. and Rock, M.K. (1961) The stability of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **236**, 2756–9.

8. 缓冲液与溶液的成分

含 1% DTAB 的碱溶液

在一份碱溶液（即碳酸氢盐碱性缓冲液或 0.2N NaOH）中加入 20% DTAB，使其最终浓度为 1%（体积比）。例如，在 4.75ml 碱性溶液中加入 0.25ml 的 20% DTAB。

碳酸氢盐碱性缓冲液

100mM	碳酸钠
20mM	碳酸氢钠
10mM	烟酰胺
0.05%	Triton® X-100

制备好的缓冲液的 pH 值大约将是 10–11。

20% DTAB

用水制备 20% DTAB（Sigma 目录号 D8638）溶液。将溶液放入 37℃ 水浴中加热至 DTAB 完全溶解。在室温或 -20℃ 下储存。

0.4N HCl

使用浓缩储液（例如 1N HCl）加水稀释制备 0.4N HCl。无需调整 pH 值。

HCl/Trizma® 溶液

加入同等体积的 0.4N HCl 和 0.5M Trizma® 碱。涡旋振荡混匀。

0.2N NaOH

使用浓缩储液（例如 1N NaOH）加水稀释至 0.2N 来制备 0.2N NaOH。无需调整 pH 值。

0.5M Trizma® 碱

将 12.1g Trizma® 碱粉末（Sigma 目录号 T1503）溶解于 200ml 水中。最终 pH 值约为 10.7。无需调整 pH 值。

备注：

对于 NaOH 和 HCl 来说，恰好 1N=1M，即 1mol/L。需说明，这种换算关系仅适用于 HCl 和 NaOH，并非通用。

9. 相关产品

产品	规格	目录号
NAD(P)H-Glo™ Detection System	10ml	G9061
	50ml	G9062
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10ml	G9081
	50ml	G9082
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5ml	J1341
Glucose-Glo™ Assay	5ml	J6021
Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J7021
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J8021
Lactate-Glo™ Assay	5ml	J5021

活力检测

产品	规格	目录号
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20ml	G8080
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10ml	G9241
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	10ml	G9681
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 reactions	G9711

细胞毒性检测

产品	规格	目录号
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10ml	G6320
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10ml	G6410

凋亡检测

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 2 Assay	10ml	G0940
Caspase-Glo® 3/7 Assay	10ml	G8091
Caspase-Glo® 6 Assay	10ml	G0970
Caspase-Glo® 8 Assay	10ml	G8201
Caspase-Glo® 9 Assay	10ml	G8211
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	10ml	G7790
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 assays	JA1011

线粒体毒性检测

产品	规格	目录号
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10ml	G8000

氧化应激检测

产品	规格	目录号
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10ml	V6911
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611

检测仪器

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	1 each	GM3000
GloMax® Explorer System	1 each	GM3500

10. 内容变更总结

此中文说明书是以 8/17 版英文说明书为基础翻译的, 8/17 版英文说明书与旧版相比做出了如下变更:

1. 未使用的还原酶底物的推荐储存温度 (3.B 节, 第 6 步) 发生了改变。
2. 相关产品 (第 9 节) 已更新, 包括了新产品。

^(a)U.S. Pat. No. 9,273,343 and other patents pending.

^(b)U.S. Pat. Nos. 6,602,677, 7,241,584, 8,030,017 and 8,822,170, European Pat. No. 1131441, Japanese Pat. Nos. 4537573 and 4520084 and other patents pending.

© 2013–2017 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter-Blue, CellTiter-Glo and GloMax are registered trademarks of Promega Corporation. ApoLive-Glo, ApoTox-Glo, CellTiter-Fluor, CellTox, CytoTox-Fluor, CytoTox-Glo, GSH-Glo, GSH/GSSG-Glo, NAD/NADH-Glo, NADP/NADPH-Glo, NAD(P)H-Glo, ToxGlo, Ultra-Glo, Glucose Uptake-Glo, Glucose-Glo, Glutamate-Glo, Glutamine/Glutamate-Glo, Lactate-Glo and RealTime-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Corning is a registered trademark of Corning, Inc. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals & Plastics Technology Corporation. Trizma is a registered trademark of Sigma-Aldrich Co.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.