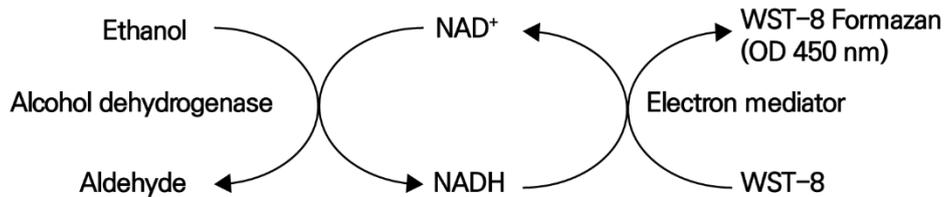


PicoSens™ NAD/NADH Assay Kit (Colorimetric)

BM-NDH-100, 100 assays

제품 원리



BIOMAX PicoSens™ NAD/NADH Assay Kit (Colorimetric)는 NAD⁺와 NADH의 산화 환원 순환 반응에서 NADH가 산화될 때 발생하는 수소원자와 WST-8이 반응하여 WST-8 Formazan을 형성하게 되고 이를 흡광도 450 nm에서 측정하여 Sample 내의 NADH와 NAD⁺를 측정할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
NAD Assay Buffer	15 ml	-20°C
NAD/NADH Extraction Buffer	25 ml X 2 Bottles	
NAD Enzyme (Lyophilized)	1 vial	
NAD(H) Probe	1 ml	
Stop Solution	1 ml	
NADH Standard (Lyophilized)	1 vial	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 6개월간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ▶ 60°C Water bath / Heating block
- ▶ Microcentrifuge
- ▶ Colorimetric microplate reader (450 nm filter)

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

NAD Assay Buffer, NAD/NADH Extraction Buffer, Stop Solution

사용 후 4°C 또는 -20°C에 보관합니다.

NAD Enzyme

D.W. 220 μ l로 녹인 후 Sample 수와 사용량에 맞게 분주합니다. 사용 후 -20°C에 보관하여 2개월 이내에 사용합니다.

NADH Standard

DMSO 200 μ l로 녹인 후 Sample 수와 사용량에 맞게 분주합니다. 사용 후 -20°C에 보관하여 2개월 이내에 사용합니다.

NAD(H) Probe

빛을 차단하여 -20°C 보관하여 2개월 이내에 사용합니다.

Sample type

- Animal tissues
- Serum, Urine
- Culture cell

Sample preparation

* Cell, Tissue lysate의 NADH는 효소들에 의해 빠르게 분해됩니다. 아래 과정 ②에서 원심분리 후 상등액을 10 kDa Centrifugal filter를 이용하여 Sample의 단백질을 제거 후 사용하시는 것을 권장합니다.

* TCA, Perchloric acid을 통한 탈단백 시료는 사용하지 않습니다.

Cell

- ① Cell을 차가운 PBS로 Washing합니다.
- ② 2×10^5 의 Cell을 Microtube에 옮겨 200 x g, 5 min 간 원심 분리하여 상등액을 버리고 Cell pellet을 확보합니다.
- ③ 400 μ l NAD/NADH Extraction Buffer를 넣고 Freeze/Thaw 과정을 2회 실시합니다.
(1회 = Dryice 20 min, 실온 10 min)
- ④ 10 sec 간 Vortex 후 4°C에서 5 min간 14,000 x g 이상으로 원심 분리하여 상등액을 새로운 Microtube에 옮겨 NADt sample로 사용합니다. (NADt = NAD + NADH)
- ⑤ NADH sample은 NADt sample을 60°C Water bath 또는 Heating block에서 30분간 Incubation한 뒤 Ice에서 냉각시킵니다. 4°C에서 1 min 간 14,000 x g 이상으로 원심 분리하여 상등액을 새로운 Microtube에 옮겨 NADH sample로 사용합니다.
- ⑥ 준비한 Sample은 Ice에 보관하여 사용합니다.

Standard preparation

NADH Standard 10 μ l와 NAD/NADH Extraction Buffer 990 μ l를 혼합하여 10 pmol/ μ l Standard solution을 만들어 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 10 pmol/ μ l Standard solution (μ l)	NAD/NADH Extraction Buffer (μ l)	Final STD Vol. in well (μ l/well)	Final STD amount in well (pmol/well)
Blank	0	50	50	0
2	2	48	50	20
3	4	46	50	40
4	6	44	50	60
5	8	42	50	80
6	10	40	50	100

* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate 이상을 권장합니다.

실험 과정

- * 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행한 후 사용을 권장합니다.
- * Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.
- * Sample의 측정 값이 높은 Background값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 Sample 를 Background control로 준비합니다.
- * Sample에 포함된 여러 화합물들이 반응을 방해할 수 있으므로 보다 정확한 실험을 위해 NADH Standard 60 pmol을 Sample에 처리 (Spike)하여 결과를 보정할 것을 권장합니다.

- ① 준비된 Sample 2~50 μ l를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 NAD/NADH Extraction Buffer로 50 μ l가 되도록 조정합니다.
- ② 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 μ l씩 분주합니다.
- ③ Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Mix	
	Reaction mix (100 μ l/well)	Background Control mix (100 μ l/well)
Assay Buffer	98 μ l	100 μ l
Enzyme Mix	2 μ l	- μ l

* 100 μ l/well 기준으로 Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction Mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)

- ④ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 혼합한 Reaction mix를 100 μ l씩 분주합니다.
 - * 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 별도의 Background control well을 준비하여 Sample solution 50 μ l에 Background control mix 100 μ l를 분주합니다.
- ⑤ Plate를 Tapping하여 잘 섞은 후 상온에서 5 min 간 반응시켜 NAD가 NADH로 변환되게 합니다.
- ⑥ 각 Well에 NAD(H) Probe 10 μ l을 분주하여 상온에서 1~4 h 반응 후 Microplate reader로 흡광도 450 nm에서 측정합니다.
 - * 발색 반응은 시간이 지남에 따라 짙어지므로 멈추길 원한다면 Stop Solution 10 μ l를 각 Well에 분주하여 반응을 중지합니다. 이는 약 48 h 발색을 유지합니다.

결과 분석

- **NADH molecular weight : 663.4 g/mol**

- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.

- 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.

* Sample background control을 설정한 경우 Sample의 측정값에서 Sample background control 측정값과 Blank 측정 값을 모두 빼줍니다.

- Standard Curve에 Sample의 OD값을 대입하여 구한 NADH의 양으로 다음 식을 이용하여 Sample 내 NADH의 농도를 구합니다.

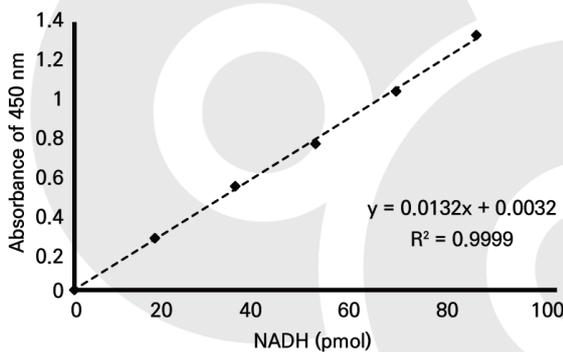
Sample 내 NADH의 농도 (C) = B / V x D (pmol/μl)

B : 측정 Well의 NADH 양 (pmol)

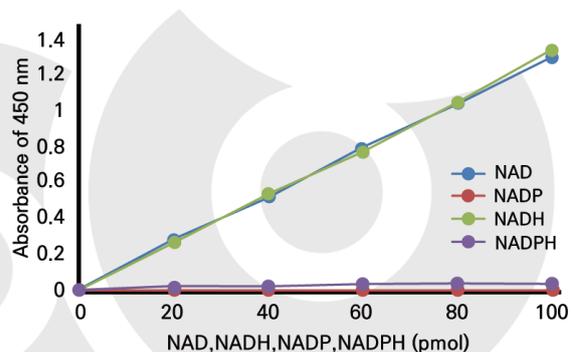
V : Well에 분주한 Sample의 Volume (μl)

D : Sample 희석 배율

- NAD/NADH ratio = (NADt - NADH) / NADH



NAD, NADH Standard curve



NAD, NADH Specificity

* **Spike sample** : Sample 내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들어 NADH가 실제로는 5 pmol이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 4 pmol (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다. 이러한 현상을 보정하기 위해 Sample과 별도로 Sample에 일정량의 Standard를 첨가한 Well을 따로 설정하여 그 결과 값을 통해 실제 Sample의 농도를 보정하는 방법입니다.

이 실험에서 Spike sample을 이용한 경우 위 농도 계산식은 다음과 같이 정리됩니다.

Sample 내 NADH의 양(B) = OD1/(OD2 - OD1) * NADH Spike (pmol)

OD1 : Sample의 OD 값 (Blank corrected)

OD2 : Spiked sample의 OD 값(Blank corrected)

NADH Spike : Sample에 넣은 NADH spike의 양

Related products

- BM-ACC-100 PicoSens™ Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BM-ATP-100 PicoSens™ ATP Assay Kit (Colorimetric/Fuorometric)
- QA-0100/1000 Quanti-ATP™ Luciferase Cell Viability Assay Kit (Luminometric)

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 **MSDS**를 참조하십시오.



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note

