

## 1. 为什么我的总 NAD / NADH 读数与我的各个 NAD / NADH 读数的总数不匹配？

答：导致这种情况的最可能原因是 NADH 提取物读数不准确。根据初始 NAD 浓度，NADH 提取液可能无法从样品孔中消除所有 NAD，这意味着某些 NAD 将保留并混淆读数。考虑到检测探针是高度敏感的，即使很小的残留 NAD 也会影响荧光测量。这就是为什么我们建议用户测量总 NAD / NADH 和 NAD 提取物的原因。然后从那里可以将 NADH 浓度计算为总 NAD / NADH 减去 NAD 提取物。通常，这将对浓度以及 NAD / NADH 比值进行更准确的测量。

## 2. Amplite™ 荧光 NAD / NADH 比率测定试剂盒\*红色荧光\*是否可以与 NADP / NADPH 一起使用？该试剂盒可以测量 NADP + 和 NADPH 吗？

答：不，此套件无法测量 NADP / NADPH。但是，我们确实提供了另一种试剂盒，可以定量 NADP / NADPH 比率。参见 [Amplite™ 荧光 NADP / NADPH 比率检测试剂盒\\*红色荧光\\*](#)

## 3. Amplite™ 荧光 NAD / NADH 比率测定试剂盒\*红色荧光\*是否可用于植物细胞？细菌细胞？哺乳动物细胞？用于组织样本？

答：是的，该试剂盒可用于植物，细菌，哺乳动物和组织细胞样品。每种细胞类型的制备指南如下：

### 植物细胞样品：

用 200 mg / mL 的裂解缓冲液匀浆叶子，并以 2500 rpm 离心 5-10 分钟，使用上清液进行测试。

### 细菌细胞样品：

离心收集细菌细胞 ((10,000 g, 0° C, 15 分钟)。使用约 100 至 1000 万个细胞/ mL 裂解液，将处理过的溶液在室温下放置 15 分钟，以 2500 rpm 离心 5 分钟后，用上清液进行测试。

### 哺乳动物细胞样品：

从板孔中除去培养基，每 1-5 百万个细胞使用约 100 μL 裂解缓冲液（或在 96 孔细胞培养板中为 50-100 μL /孔），并将处理过的溶液在室温下放置 15 分钟。直接使用细胞裂解液或以 1500 rpm 离心 5 分钟，将上清液用于测试。

### 组织样品：

称量约 20 mg 组织，用冷 PBS 洗涤。在微量离心管中用 400  $\mu$ L 裂解缓冲液匀浆。以 2500 rpm 离心 5–10 分钟，将上清液用于测定。

**4. Amplate™荧光 NAD / NADH 比率测定试剂盒\*红色荧光\* pH 敏感吗？我是否必须在特定的 pH 缓冲液中准备样品？pH 值会影响我的荧光读数吗？**

答：pH 是 NAD 或 NADH 萃取步骤中的一个因素。NADH 提取步骤（和相应的缓冲液，组分 D）是碱性的（pH > 7），而 NAD 提取步骤（和相应的缓冲液，组分 E）是酸性的（pH < 7）。此外，与大多数荧光探针一样，我们的 NADH 传感器对 pH 敏感。读数应在中性条件下（pH ≈ 7）进行。

**5. 典型的 NAD 与 NADH 比率是多少？**

答：在哺乳动物细胞中，总 NAD / NADH 比率通常被引用为 10: 1，而游离细胞质 NAD / NADH 比率估计约为 725: 1。

**6. NADH 和 ROS 是否相关？**

答：活性氧（ROS）是涉及氧化还原反应的多种细胞途径的潜在破坏性生化副产物，其中最主要的贡献者是辅酶 NAD<sup>+</sup> 和 NADP 促进的能量途径。这些辅酶的还原形式用于 ROS 的解毒，各种 ROS 本身以临时方式用于细胞内和细胞间信号传导。目前在细胞中约有 400 个已知的涉及 NAD<sup>+</sup> / NADH 的氧化还原反应，另外约 30 个涉及磷酸化的 NADP / NADPH 的氧化还原反应。这些分子的深远影响使得它们的测量和可视化即使在看似无关的实验中也很有用。

**7. 如何为 Amplate™荧光 NAD / NADH 比分析试剂盒\*红色荧光\*制备/裂解细胞样品？**

答：提供了裂解缓冲液（组分 G）。您可以使用 [《细胞样品制备方案》](#) 中概述的样品制备指南。

**8. 我能在不溶解细胞的情况下测量 NADPH 吗？**

**答：**大多数传统的印迹和蛋白质检测方法都涉及细胞裂解物，但近年来，已开发出新的探针，可以可视化活细胞中 NADP<sup>+</sup> / NADPH 的水平。细胞内探针将使研究人员无需进行细胞裂解步骤即可进行测量。对于多参数实验，请选择处于极端波长的荧光团，以减少光谱重叠和数据校正的必要性。

产品名称	传感器	颜色	仪器	规格	货号
Cell Meter™ 细胞内 NADH / NADPH 荧光成 像试剂盒	JZL1707 NAD (P)H 传感器	红色荧光	荧光酶标仪 荧光显微镜	100tests	<a href="#">15290</a>
	JJ1902 NAD (P)H 传感器	深红色荧光		100tests	<a href="#">15295</a>
Cell Meter™ 细胞内 NADH / NADPH 流式细 胞分析仪	JZL1707 NAD (P)H 传感器	红色荧光	流式细胞仪	100tests	<a href="#">15291</a>
	JJ1902 NAD (P)H 传感器	深红色荧光		100tests	<a href="#">15296</a>

9. 在 NADP / NADPH (或 NAD / NADH) 分析中分析细胞裂解物之前，我们是否需要对样品进  
行脱蛋白处理？

**答：**不，细胞裂解液无需脱蛋白即可直接使用。以下是有关如何制备用于 NAD / NADH 和 NADP / NADPH 分析的 HL60 细胞裂解液的示例协议：

- (1) 1 mL HL 60 细胞 ( $1 \sim 2 \times 10^6$  细胞/ mL)
- (2) 离心去除培养基
- (3) 向细胞沉淀中加入 200  $\mu$ L 裂解缓冲液
- (4) 在 37° C 下孵育 15 分钟
- (5) 离心 5 分钟以去除细胞沉淀
- (6) 上清液可直接用作样品

10. 哪些检测试剂盒可测量细胞样品中的 NAD / NADH?

**答：**我们提供比色和荧光分析试剂盒，用于测量细胞样品中的 NAD, NADH, NAD / NADH 比以及总 NAD 和 NADH，请参见下表。

货号	产品名称	Ex (nm)	Em (nm)	Detection Limit	Dynamic Range
15257	<a href="#"><u>Amplite NAD+/NADH 检测试剂盒 (荧光法) 红色荧光</u></a>	571	585	0.1 $\mu$ M	0-3 $\mu$ M
15258	<a href="#"><u>Amplite NAD+/NADH 检测试剂盒 (比色法)</u></a>	575		0.3 $\mu$ M	0-10 $\mu$ M
15261	<a href="#"><u>Amplite NADH 检测试剂盒 (荧光法) 红色荧光</u></a>	571	585	1 $\mu$ M	0-100 $\mu$ M
15263	<a href="#"><u>Amplite NAD/NADH 比率检测试剂 盒 (荧光法) 红色荧光</u></a>	571	585	0.1 $\mu$ M	0-3 $\mu$ M
15271	<a href="#"><u>Amplite NADH 检测试剂盒 (比色法)</u></a>	460		3 $\mu$ M	1-200 $\mu$ M
15273	<a href="#"><u>Amplite NAD/NADH 比率检测试剂 盒(比色法)</u></a>	460		0.1 $\mu$ M	0.1-10 $\mu$ M
15275	<a href="#"><u>Amplite NAD+/NADH 检测试剂盒 (比色法) 增强灵敏度</u></a>	460		0.1 $\mu$ M	0.1-10 $\mu$ M
15280	<a href="#"><u>Amplite NAD 检测试剂盒 (荧光法) 蓝色荧光</u></a>	422	466	0.03 $\mu$ M	0.03-10 $\mu$ M