

EZ- NAD/NADH Assay Kit

Metabolism Assay Kit
(Colorimetric)

Cat. No. DG-NAD100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)는 모든 살아있는 세포에서 발견되는 인자로 산화형 NAD⁺와 환원형 NADH 두 가지 형태로 존재합니다.

Alcohol dehydrogenase (ADH) 반응을 이용해 ethanol을 acetaldehyde로 전환하면서 NAD⁺를 NADH로 환원시키고, NADH가 산화되면서 발생하는 수소원자와 WST-8이 반응하여 WST-8 formazan을 형성합니다. 이때 생성된 NADH의 양은 반응에 참여한 기질의 양과 1:1로 비례하게 됩니다.

EZ-NAD/NADH Assay Kit는 총 NAD (NAD⁺와 NADH의 총합) 수치와 NADH 수치를 각각 쉽게 측정할 수 있으며, 총 수치에서 NADH를 수치 값을 빼는 방식으로 NAD⁺의 양을 간편하게 확인할 수 있습니다.

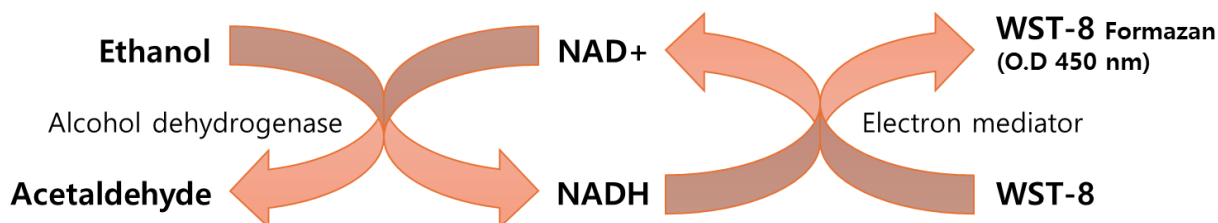


Fig 1. Detection mechanism with EZ-NAD/NADH Assay Kit

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assays	Storage
NAD/NADH Extraction Buffer	25 mL X 2	-20 °C
NAD Assay Buffer	8 mL X 2	
 NAD Enzyme Mix	1 vial	
 NAD/NADH Probe	1 mL	
 Stop Solution	1 mL	
 NADH Standard (1 mM)	1 vial	

* NAD Enzyme Mix 및 NADH Standard는 필요한 양만큼 분주 후 사용하세요.

* Extraction Buffer 및 Assay Buffer는 상온에서 충분히 녹인 후 사용하세요.

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안 됩니다.

▪ Preparation of Reagent

Component	Preparation	Storage and Stability
NAD/NADH Extraction Buffer	사용 직전 protease inhibitor 를 1X가 되도록 첨가합니다.	Protease inhibitor 첨가 후 -20°C에 보관하십시오.
NAD Enzyme Mix	D.W 220 μl 넣어 부드럽게 inverting 하며 잘 섞어줍니다.	개봉 후 소분하여 -20°C에서 보관하고, 2개월 이내에 사용 하십시오.
NADH Standard (1 mM)	NAD Assay Buffer 200 μl 넣어 부드럽게 inverting 하며 잘 섞어줍니다.	

* 본 protocol은 96-well plate를 이용하여 실험/측정하도록 최적화 되어있습니다.

▪ General Protocol

Sample preparation

Note

- 미지의 sample의 경우 standard curve 범위 내에 포함되는지 확인하기 위해 본 실험 전 예비실험을 권장합니다.
- Sample은 가급적 바로 사용하시는 것이 좋으며, 만약 즉시 분석이 불가능하다면 샘플 준비 단계를 마친 후 -20°C에 보관하거나 추출 직후 액체 질소로 급속 냉동하여 -80°C에 보관합니다.
- Serum, Tissue, Cell의 NADH는 효소에 의해 소비될 수 있어 10 kDa Spin Column으로 필터링 하여 효소를 제거하세요.
- Sample은 해동 시 얼음 위에서 천천히 해동한 후 사용하십시오.

● Serum

- ① 10 kDa Spin Column에 serum 샘플을 통과시켜 효소들을 제거합니다.
 - 4 °C, 최고 속도로 10분 동안 샘플을 centrifuge하여 여과액을 사용합니다.
- ② 여과액은 분석에 바로 사용합니다.

● Tissue

- ① Tissue를 차가운 PBS로 세척 후 sample별로 조직 (20 ~ 40 mg)을 준비합니다.
- ② Dounce homogenizer를 이용해 400 μ l NAD/NADH Extraction Buffer를 첨가하여 균질화합니다 (30 ~ 50회 반복).
- ③ 불용성 물질을 제거하기 위해 4 °C, 최고 속도로 5분간 centrifuge합니다.
- ④ 상층액을 새 튜브에 옮기고 얼음 위에 보관합니다. (NADt sample)

● Cell lysate

NADt Sample Preparation

- ① Cell을 차가운 PBS로 세척합니다.
- ② Microtube에 cell을 넣은 후 200 x g로 5분 centrifuge하여 상층액을 버립니다.
 - Cell 수는 세포주마다 차이가 있을 수 있으므로, 권장 범위 ($2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$)를 참고하여 실험하는 세포에 맞게 최적화하여 진행해주세요.
- ③ 400 μ l의 NAD/NADH Extraction Buffer를 넣은 후 freeze-thaw cycle을 2회 반복합니다.
 - 1회 당: Deep freezer (-80 °C)에서 20분, 상온에서 10분
- ④ 10초 동안 vortex 한 후 4 °C, 최고 속도로 5분간 centrifuge합니다.
- ⑤ 새로운 microtube에 상층액을 옮기고, 얼음 위에 보관하면서 NADt sample로 사용합니다. (NADt sample = NAD + NADH)
 - NADt만 측정 시 아래 단계는 생략합니다.

NADH Sample Preparation

- ① NADH 단독 측정을 위해 NADt sample 200 μ l를 새로운 microtube에 옮겨 60 °C heat block 또는 water bath에서 30분간 incubation합니다.
 - Sample을 바로 사용하지 않을 시 NADt sample 상태로 deep freezer에 보관 후 실험 진행 시 NADH sample을 제조합니다.
 - 열처리 후 생긴 NADH는 freeze-thaw에 취약하여 실험 당일에 제조합니다.
- ② 바로 얼음 위에서 냉각 후 4 °C, 최고 속도로 1~2분간 centrifuge합니다.
- ③ 새로운 microtube에 상층액을 옮기고, 얼음위에 보관합니다. (NADH 샘플)

NADH standard preparation

: NADH Standard (1 mM) 10 μL 와 Extraction Buffer 990 μL 를 microtube에 혼합하여 10 pmol/ μL standard solution (10 μM NADH) 제조하고, 아래 표와 같이 준비합니다.

Standard Tube No.	10 μM NADH standard solution (μL)	NAD/NADH Extraction Buffer (μL)	Final volume (μL /well)	Final NADH Amount (pmol/well)
1	-	125	125	0
2	5	120	125	20
3	10	115	125	40
4	15	110	125	60
5	20	105	125	80
6	25	100	125	100

* Standard는 매 실험 시 함께 측정하는 것을 권장합니다.

* 실험 중 Sample 및 Enzyme은 열에 취약하므로 얼음 위에 보관하여 진행합니다.

NAD/NADH Assay

- ① NADH standard solution을 농도별로 50 μL 씩 duplicate로 준비합니다.
- ② NADt, NADH sample 2 ~50 μL 씩 duplicate로 준비한 후 Extraction Buffer로 최종 volume을 50 μL 로 맞춰줍니다.
- ③ 아래 표와 같이 Reaction Mix를 well+1만큼 준비합니다.

Component	Reaction Mix (μL)	Background Reaction Mix (μL)
NAD Assay Buffer	98	100
NAD Enzyme Mix	2	-

- ④ Reaction Mix를 inverting 후 NADH Standard, sample well에 100 μL 씩 분주합니다.
- ⑤ NAD를 NADH로 변환시키기 위해 plate를 tapping 또는 plate shaker를 사용하여 섞어준 후 상온에서 5분간 반응시켜줍니다.
- ⑥ 각 well에 NAD Probe 10 μL 를 넣어 상온에서 0 ~ 2 hr 반응 후 microplate reader로 450 nm에서 측정합니다.
 - Plate를 여러 시간동안 측정하거나 kinetics으로 측정하는 것을 권장드립니다.
 - O.D 값에 따라 배양시간이 달라질 수 있으며, 원하는 O.D 값에 도달했을 때 Stop Solution 10 μL 를 각 well에 처리 시 반응을 멈출 수 있습니다.

▪ Calculation

NADH concentration of sample (pmol/ $\mu\ell$ = μM)

1. Standard, sample, sample background의 duplicate 측정값에 대한 평균을 구합니다.
2. Sample background 값이 높다면 sample 측정값에서 background 값을 빼줍니다.
3. 모든 측정값에서 Blank O.D를 빼 보정된 O.D값(Corrected absorbance)을 구합니다.
* Blank = O.D_{450nm} from NADH standard No. 1 (0 pmol NADH)
4. NADH standard의 농도(X 축)에 대한 O.D. 값(Y축)을 이용하여 표준곡선을 그려 선형 방정식을 구합니다.
5. Standard curve에 sample 측정값 수치를 대입하여 NADH 양을 계산하여 줍니다.
6. Sample의 NADt or NADH 농도는 다음과 같이 계산합니다.

$$\text{NADt or NADH Concentration} = \frac{\text{NADH}}{V} \times D = \text{pmol}/\mu\ell = \mu\text{M}$$

NADH = 측정한 well의 NADH 양 (pmol)

V = Well의 Sample Volume ($\mu\ell$)

D = Sample의 희석 배수

7. NAD/NADH ratio는 다음과 같이 계산합니다.

$$\text{NAD/NADH ratio} = \frac{\text{NADt} - \text{NADH}}{\text{NADH}}$$

Fig 2. Nitrite standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

Spike sample

: 샘플 내 성분들의 방해(Matrix effect)로 인해 NADH 수치는 실제보다 낮거나 높게 측정될 수 있습니다. 이러한 오차를 보정하고 정확한 농도를 확인하기 위해, 샘플에 일정량의 표준물질(Standard)을 추가하는 스파이킹(Spiking)법을 사용합니다.

(예: 60 pmol, 즉 10 pmoles/ μL NADH standard 6 μL).

$$\text{NADt or NADH} = \frac{\text{Sample O.D}}{\text{Spiked Sample O.D} - \text{Sample O.D}} \times \text{amount of NADH spike (pmol)}$$

Spiked Sample을 통해 NADt 및 NADH 농도를 구한 후 위 7번 계산법으로 NAD/NADH ratio를 계산할 수 있습니다.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione peroxidase (GPx) Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay
	EZ-NAD/NADH Assay Kit (Colorimetric)	DG-NAD100	100 Assay