

NAD/NADH Assay Kit-WST

Technical Manual

はじめに

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)は、解糖系や電子伝達系、TCA回路など、細胞内の主要な代謝経路での酸化還元反応に関与する重要な補酵素です。NADは細胞内において、酸化型のNAD⁺と還元型のNADHとして存在していますが、これらの量を適切な状態で維持することが細胞機能には必須となっています。また、最近の研究では、NAD⁺量の低下と老化との関連も明らかにされており¹⁾、老化関連疾患に対する研究における指標の1つとしてもよく用いられています。

NAD/NADH Assay Kit-WSTは、細胞内の総NAD⁺/NADH量、NADH量およびNAD⁺量の定量および、NAD⁺とNADHの比率を測定することができるキットです。本キットに含まれる抽出バッファーを用いて調製した細胞ライセートを加熱処理することにより、細胞内NADH量のみを定量することができ、別途測定した総NAD⁺/NADH量からNADH量を差し引くことで、細胞内NAD⁺量を求めることが可能です。



図1 NAD/NADH Assay Kit-WSTによる測定原理

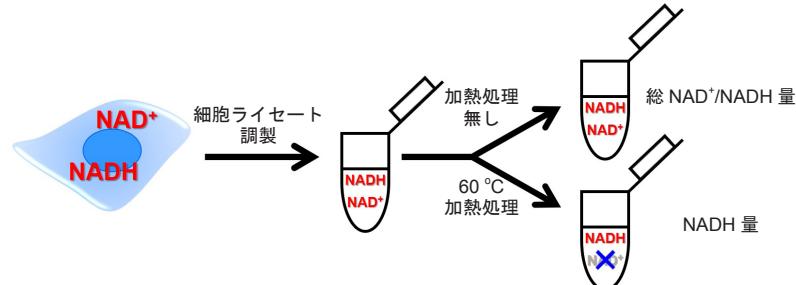


図2 NAD/NADH Assay Kit-WSTを用いた総NAD⁺/NADH量、NADH量およびNAD⁺量の検出方法

キット内容

NAD/NADH Extraction Buffer	20 ml × 1
NAD/NADH Control Buffer	20 ml × 1
Standard Buffer	10 ml × 1
Assay Buffer	5.5 ml × 1
Dye Mixture (赤キャップ)	550 µl × 1
Enzyme (緑キャップ)	× 1
Standard (青キャップ)	× 1
Filtration Tube	× 12

保存条件

0-5 °Cで保存して下さい。

必要なもの (キット以外)

- プレートリーダー(450 nmの吸光フィルター)
- 96穴マイクロプレート
- インキュベーター(37 °C、60 °C)
- 20-200 µlのマルチチャンネルピペット
- 100-1000 µl、20-200 µl、2-20 µlマイクロピペット

使用上のご注意

- キットの中の試薬は、室温に戻してからご使用下さい。
- 輸送中の振動等により、内容物がアシストチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、開封前に振り落としてからご使用下さい。
- 正確な測定値を得るために、1つの測定試料につき複数(n=3以上)のウェルをご使用下さい。
- Working solutionをサンプルに加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグによる測定誤差を少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用ください。
- 測定試料は、検量線範囲内に入るように希釈したものを数種類調製し、測定に用いて下さい。

溶液調製

Enzyme stock solution の調製

EnzymeにPBS 35 µlを加え、ピッティングにより溶解する。

※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。

※Enzyme stock solutionは氷浴上で使用し、溶解後は冷蔵保存(0-5 °C)して下さい(2ヶ月間安定)。

Standard stock solution (10 mmol/l) の調製

Standardに超純水20 µlを加え、ピッティングにより溶解する。

※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。

※Standard stock solutionは氷浴上で使用し、溶解後は冷蔵保存(0-5 °C)して下さい(2ヶ月間安定)。

Working solution の調製

(1)コニカルチューブにDye Mixtureを加え、Assay Bufferで希釈する。

(2)操作(1)で調製した溶液にEnzyme stock solutionを加える。

※Working solution調製における各溶液使用量は、表1を参照して下さい。

※Working solutionは光に不安定であるため、使用直前に調製し、調製後はアルミホイルで覆うなどして遮光して下さい。また、調製後のWorking solutionは保存できません。その日のうちに使い下さい。

	48ウェル分	96ウェル分
Dye Mixture	270 µl	540 µl
Assay Buffer	2.43 ml	4.86 ml
Enzyme stock solution	13.5 µl	27 µl

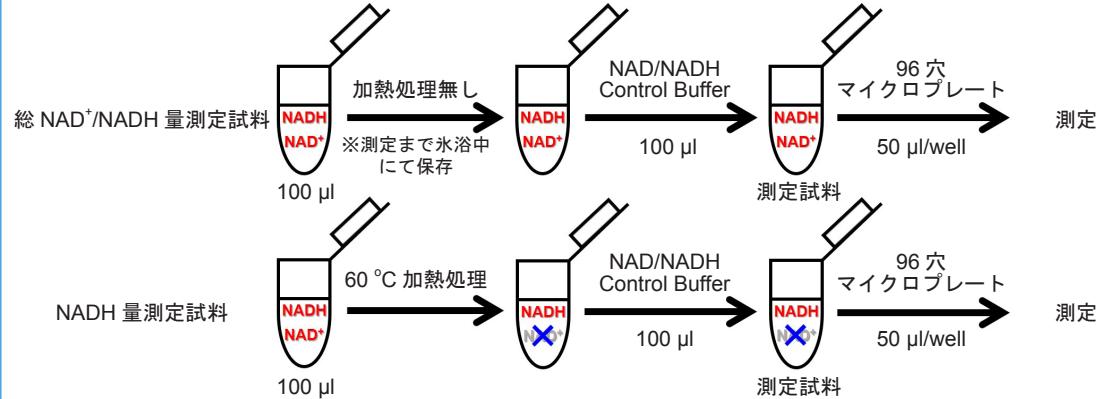
表1 Working solution調製例

操作

1. 測定用サンプルの調製

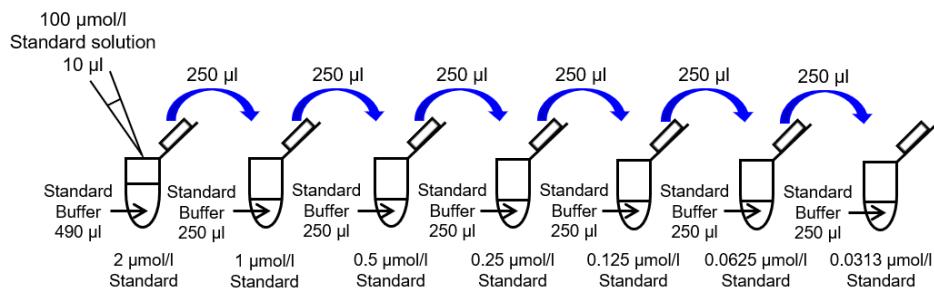
- (1) 細胞 ($2.5-10 \times 10^5$ cells) を 1.5 ml マイクロチューブに準備する。
- (2) $300 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を除去する。
- (3) PBS 500 μl を加え、ピッピングにより懸濁後、 $300 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を除去する。
- (4) NAD/NADH Extraction Buffer 300 μl を加え、ピッピングにより細胞を溶解した後、 $12,000 \times g$ で 5 分間遠心する。
- (5) 上清 250 μl を MWCO 10K フィルトレーションチューブに移し、 $12,000 \times g$ で 10 分間遠心する。
- ※測定用サンプルは、総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量の両方を測定する場合、合計 200 μl 以上は必要です。
- (6) 得られた濾液を、1.5 ml マイクロチューブ 2 本に 100 μl ずつ移し、総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量測定試料とする(図 3 参照)。
- (7) NADH 量測定試料を $60^{\circ}C$ で 60 分間インキュベートする。
- ※本操作により、NADH 量測定試料中に含まれる NAD⁺ を分解します。
- ※総 NAD⁺/NADH 量測定試料は測定までの間、氷浴中で保存して下さい。
- (8) インキュベート後、測定試料を室温まで冷却する。
- (9) 操作 (6) および操作 (8) で調製した、総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量測定試料が入ったチューブそれぞれに、NAD/NADH Control Buffer 100 μl を加えたものを測定に用いる(Sample)。
- ※測定試料は 1 ウエルあたり 50 μl 必要です。

※測定試料は、検量線範囲内に入るように NAD/NADH Control Buffer で希釈したものを数種類調製してから測定して下さい。



2. Standard solution の調製

- (1) 10 mmol/l Standard stock solution 2 μl を超純水 198 μl で希釈し、100 $\mu mol/l$ Standard solution を調製する。
- (2) 操作 (1) で調製した 100 $\mu mol/l$ Standard solution 10 μl をさらに Standard Buffer 490 μl で希釈し、2 $\mu mol/l$ Standard solution を調製する。さらに順次 2 倍希釈していき、標準液(2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0 $\mu mol/l$)とする(図 4 参照)。



3. 測定

- (1) Standard solution および Sample を 50 μl ずつ、各ウエルに入れる(図 5 参照)。
※正確な測定値を得るために、1つの測定試料につき複数($n=3$ 以上)のウエルをご使用下さい。
- (2) Working solution 50 μl を各ウエルに入れる。
※ Working solution を加えると直ちに発色が始まります。
各ウエル間のタイムラグを少なくするためにマルチチャンネルピッペットをご使用下さい。
- (3) $37^{\circ}C$ で 60 分間インキュベートする。
※インキュベートする際は、溶液の揮発を防ぐため、マイクロプレート用シール等をご使用下さい。
- (4) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。
- (5) 測定試料(Sample)中の総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量を検量線より求める。
※これにより求められた値は、調製した測定試料溶液中の濃度です。希釈前の試料中に含まれる濃度は、得られた測定値と試料の希釈倍率より算出して下さい。
※ NAD⁺ 量は以下の計算式より算出します。
$$\text{NAD}^+ \text{量} = \text{総 NAD}^+/\text{NADH} \text{量} - \text{NADH} \text{量}$$

	1	2	3	4	5	6
A	0 $\mu mol/l$ Standard	Sample 1 (総NAD ⁺ /NADH量)				
B	0.0313 $\mu mol/l$ Standard	Sample 1 (NADH量)				
C	0.0625 $\mu mol/l$ Standard	Sample 2 (総NAD ⁺ /NADH量)				
D	0.125 $\mu mol/l$ Standard	Sample 2 (NADH量)				
E	0.25 $\mu mol/l$ Standard	Sample 3 (総NAD ⁺ /NADH量)				
F	0.5 $\mu mol/l$ Standard	Sample 3 (NADH量)				
G	1 $\mu mol/l$ Standard	Sample 4 (総NAD ⁺ /NADH量)				
H	2 $\mu mol/l$ Standard	Sample 4 (NADH量)				

図 5 Standard solution とサンプルのプレートレイアウト例($n=3$)

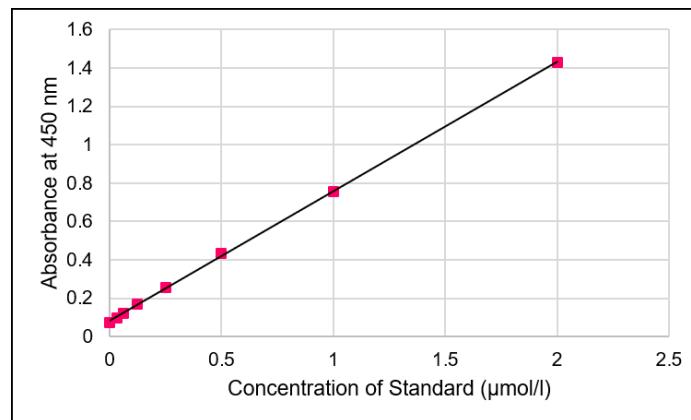


図 6 Standard 検量線の例

実験例 HeLa 細胞中総 NAD⁺/NADH 量、NAD⁺ 量、NADH 量、NAD⁺/NADH 比の解析

- (1) HeLa 細胞 (2.5 および 5.0×10^5 cells/tube) をそれぞれ 1.5 ml マイクロチューブに回収した。
- (2) 300×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。
- (3) PBS 500 μl を加え、ピペッティングにより懸濁後、300×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。
- (4) NAD/NADH Extraction Buffer 300 μl を加え、ピペッティングにより細胞を溶解した後、12,000×g で 5 分間遠心した。
- (5) 上清 250 μl を MWCO 10K フィルトレーションチューブに移し、12,000×g で 10 分間遠心した。
- (6) 得られた濾液をそれぞれ 1.5 ml マイクロチューブ 2 本に 100 μl ずつ移し、総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量測定試料とした。総 NAD⁺/NADH 量測定試料は測定まで氷浴中にて保存した。
- (7) NADH 量測定試料を 60 °C で 60 分間インキュベートし、室温まで冷却した。
- (8) 総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量測定試料が入ったチューブに、NAD/NADH Control Buffer 100 μl をそれぞれ加え、測定試料とした。
- (9) Standard solution を調製し、標準液を調製した (Standard solution の調製参照)。
- (10) 調製した測定試料および Standard solution を 50 μl ずつ、96 穴プレートに入れた。
- (11) 調製した Working solution 50 μl を各ウェルに加えた。
- (12) 37 °C で 60 分間インキュベートした。
- (13) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定し、測定試料中総 NAD⁺/NADH 量および NADH 量を検量線により求めた。NAD⁺ 量は、求めた総 NAD⁺/NADH 量から NADH 量を引くことにより算出した。

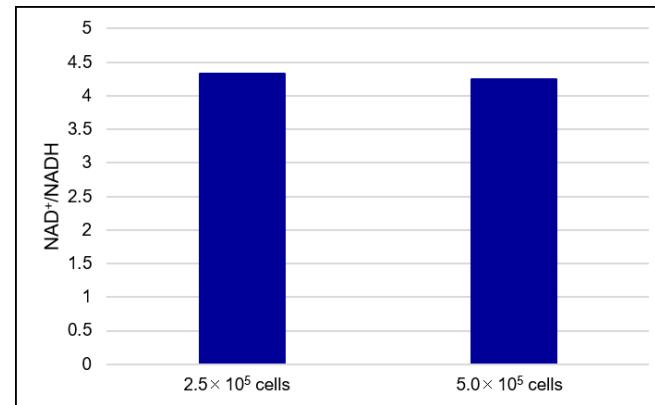
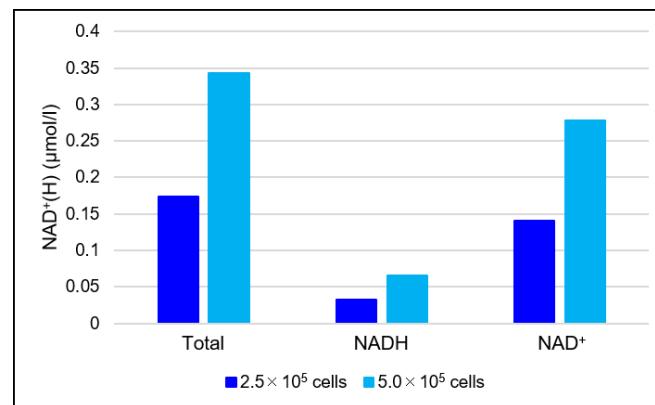


図 7 HeLa 細胞中総 NAD⁺/NADH 量、NAD⁺ 量、NADH 量および NAD⁺/NADH 比

参考文献 1) S.Imai, et al., *Trends Cell Biol.*, 2014, 24, 464.

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

Dojindo 株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル: 0120-489548
フリーファックス: 0120-021557