

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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 量の低下と老化との関連も明らかにされており<sup>1)</sup>、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<sup>+</sup>/NADH 量、NADH 量および NAD<sup>+</sup> 量の定量および、NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/NADH 量から NADH 量を差し引くことで、細胞内 NAD<sup>+</sup> 量を求めることが可能です。

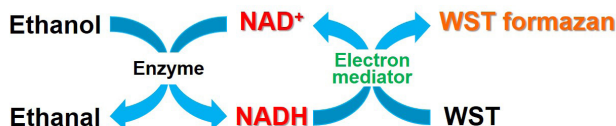


図 1 NAD/NADH Assay Kit-WST による測定原理

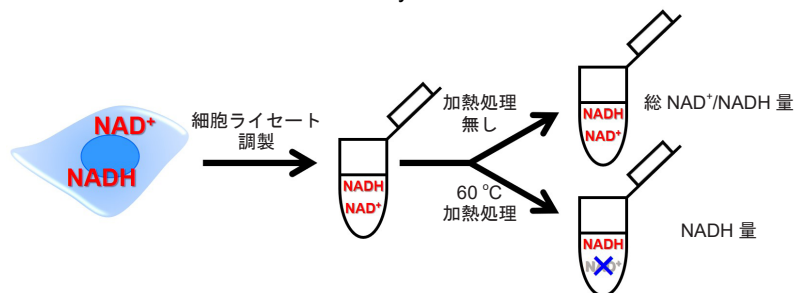


図 2 NAD/NADH Assay Kit-WST を用いた総 NAD<sup>+</sup>/NADH 量、NADH 量および NAD<sup>+</sup> 量の検出方法

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       |

※本キットでは、n=3 の測定で標準サンプル 8 点と測定用サンプル 12 サンプル分の測定が可能です。そのため、Filtration Tube は 12 サンプル分を同梱しております。12 サンプル以上の測定試料を調製する際は、別途 Filtration Tube (ナノセップ遠心ろ過デバイス (10K)[OD010C33]、PALL 社) をご準備頂く必要があります。

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、ピペ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、ピペ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。その日のうちにお使い下さい。

|                       | 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

### 1. 測定用サンプルの調製

- (1) 細胞 (2.5–10×10<sup>5</sup> cells) を 1.5 mL マイクロチューブに準備する。
  - (2) 300×g で 5 分間遠心し、上清を除去する。
  - (3) PBS 500 μL を加え、ピペティングにより懸濁後、300×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、ピペティングにより細胞を溶解した後、12,000×g で 5 分間遠心する。
- ※ピペティング後、溶液の粘性が高いと遠心後の分離が困難になる場合があります。その際は、シリンジに 25G 程度の細い針を付け、サンプル溶液をシリンジでスムーズに出し入れができるまで (20–30 回) 混合してお使い下さい。
- (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 分間遠心する。
- ※測定用サンプルは、総 NAD<sup>+</sup>/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。  
 ※遠心後の濾液が 200 μL 以上ない場合は、遠心時間を延長して下さい。
- (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<sup>+</sup>/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 °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<sup>+</sup> を分解します。  
 ※総 NAD<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>/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 ウェルあたり 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。

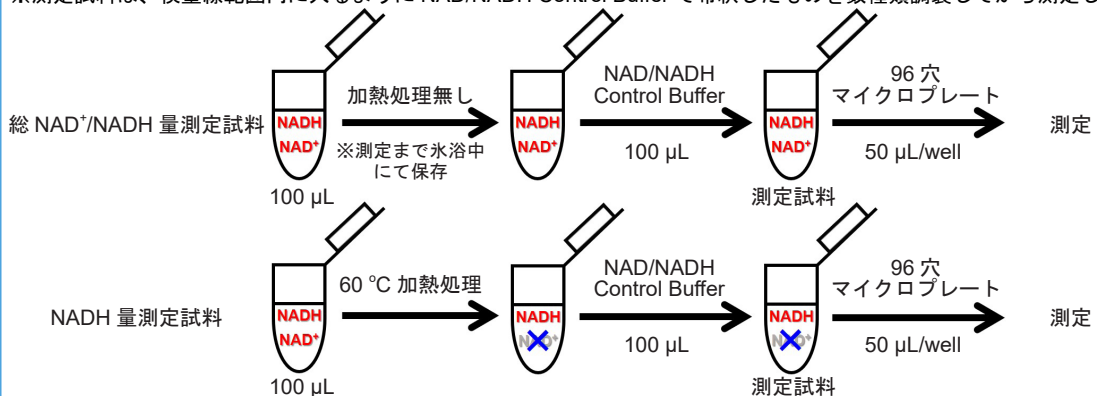


図 3 測定サンプルの調製方法

### 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 μmol/L Standard solution を調製する。
- (2) 操作 (1) で調製した 100 μmol/L Standard solution 10 μL をさらに Standard Buffer 490 μL で希釈し、2 μmol/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 μmol/L) とする (図 4 参照)。

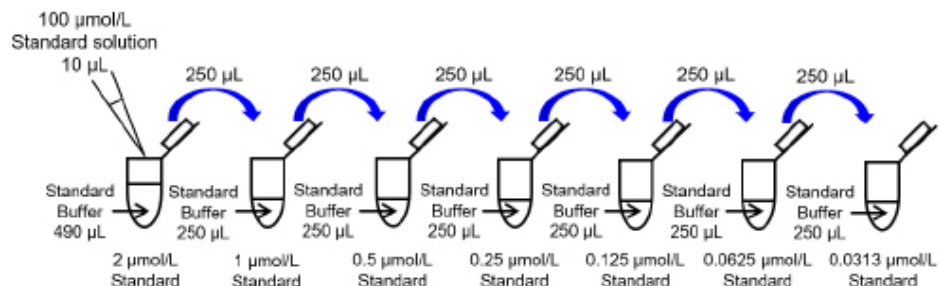


図 4 Standard solution の調製方法

### 3. 測定

- (1) Standard solution および Sample を 50 μL ずつ、各ウェルに入れる (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) のウェルをご使用下さい。
- (2) Working solution 50 μL を各ウェルに入れる。  
 ※ Working solution を加えると直ちに発色が始まります。各ウェ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ペットをご使用下さい。
- (3) 37 °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<sup>+</sup>/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<sup>+</sup> 量は以下の計算式より算出します。  
 NAD<sup>+</sup> 量 = 総 NAD<sup>+</sup>/NADH 量 – NADH 量

|   | 1                      | 2                                   | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|------------------------|-------------------------------------|---|---|---|---|
| A | 0 μmol/L Standard      | Sample 1 (総NAD <sup>+</sup> /NADH量) |   |   |   |   |
| B | 0.0313 μmol/L Standard | Sample 1 (NADH量)                    |   |   |   |   |
| C | 0.0625 μmol/L Standard | Sample 2 (総NAD <sup>+</sup> /NADH量) |   |   |   |   |
| D | 0.125 μmol/L Standard  | Sample 2 (NADH量)                    |   |   |   |   |
| E | 0.25 μmol/L Standard   | Sample 3 (総NAD <sup>+</sup> /NADH量) |   |   |   |   |
| F | 0.5 μmol/L Standard    | Sample 3 (NADH量)                    |   |   |   |   |
| G | 1 μmol/L Standard      | Sample 4 (総NAD <sup>+</sup> /NADH量) |   |   |   |   |
| H | 2 μmol/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)

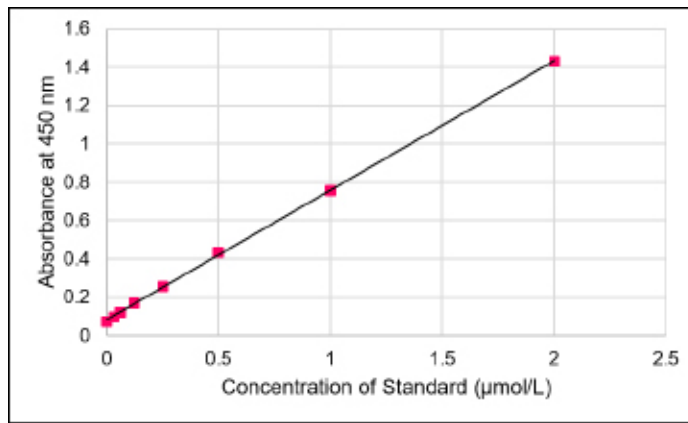


図6 Standard 検量線の例

実験例

HeLa 細胞中総 NAD<sup>+</sup>/NADH 量、NAD<sup>+</sup> 量、NADH 量、NAD<sup>+</sup>/NADH 比の解析

- (1) HeLa 細胞 (2.5 および 5.0×10<sup>5</sup> 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<sup>+</sup>/NADH 量および NADH 量の測定試料とした。総 NAD<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>/NADH 量および NADH 量を検量線より求めた。NAD<sup>+</sup> 量は、求めた総 NAD<sup>+</sup>/NADH 量から NADH 量を引くことにより算出した。

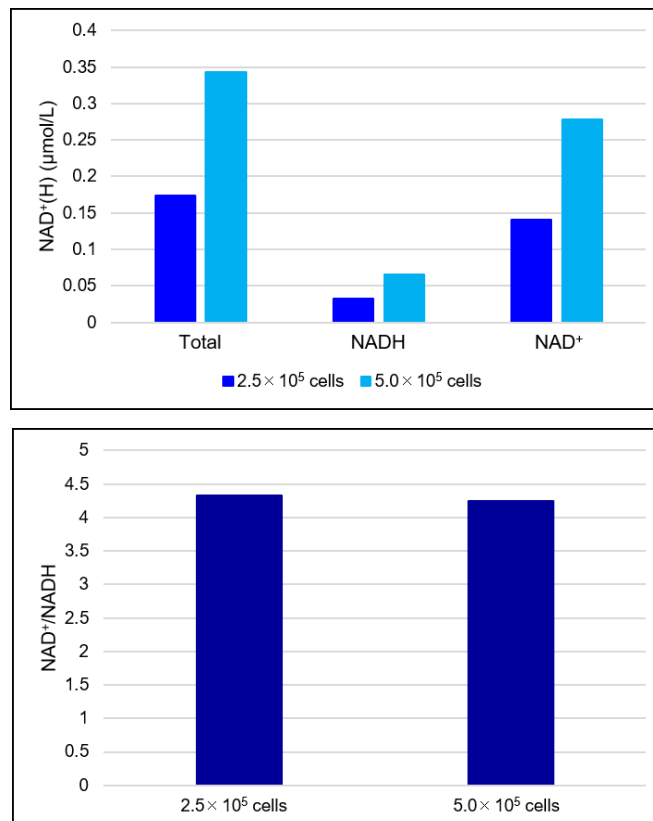


図7 HeLa 細胞中総 NAD<sup>+</sup>/NADH 量、NAD<sup>+</sup> 量、NADH 量および NAD<sup>+</sup>/NADH 比

- 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