



## NAD 激酶(NADK) 试剂盒说明书

(货号: PB1025F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

### 测定意义:

NADK (EC 2.7.1.23) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是目前所发现的生物体内惟一能够催化 NAD<sup>+</sup>磷酸化生成 NADP<sup>+</sup>的酶, 可催化 NAD(H)以 ATP 或无机多聚磷酸[poly(P)]作为磷酸基供体进行磷酸化反应, 生成 NADP(H)。因此, NAD 激酶在合成 NADP(H)以及调节 NAD(H)与 NADP(H)的平衡上具有重要作用。

### 测定原理:

NADK 催化 NAD<sup>+</sup>磷酸化, 生成 NADP<sup>+</sup>; NADP<sup>+</sup>可被 6-磷酸葡萄糖脱氢酶还原为 NADPH; NADPH 通过 PMS 的递氢作用, 还原氧化型噻唑蓝 (MTT), 通过在 600 nm 下测定 MTT 的还原速度 (吸光值的变化) 可反映出 NADK 活性的大小。

### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制:

提取液: 液体 50 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 10 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 50 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 用时加入 300μL 双蒸水, 充分溶解, -20℃ 可保存两周, 禁止反复冻融;

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 用时加入 300μL 双蒸水, 充分溶解, 4℃ 保存;

试剂五: 粉剂×2 支, -20℃ 保存, 用时每支加入 275μL 双蒸水, 充分溶解, 4℃ 保存;

试剂六: 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 用时加入 550μL 双蒸水, 充分溶解, 4℃ 保存;

试剂七: 粉剂×1 支, 4℃ 保存, 用时加入 550μL 双蒸水, 充分溶解, 4℃ 避光保存;

试剂八: 液体×1 支 1mL, 4℃ 保存。

### 样本测定的准备:

#### 1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 弃上清, 按照每 200 万细菌或细胞加入 400μL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30s); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆; 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

### 测定步骤 (在 1.5mLEP 管中操作):

试剂名称(μL)	测定孔
样本	20
试剂一	70
试剂三	5
试剂四	5



蒸馏水	
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15min， 立即煮沸 2min（盖紧，防止水分散失）	
试剂二	870
试剂五	10
试剂六	10
试剂七	10
试剂八	20

充分混匀，在 600nm 下测定 30 秒的吸光值 A1 和 3 分钟 30 秒时的吸光值 A2，计算  $\Delta A = A2 - A1$

### 注意事项：

1、粗酶液的提取必须在 0℃ - 4℃ 中操作完成，以防止酶变性失活。

### NADK 活性计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$NADK (U/mg \text{ prot}) = 406 \times (\Delta A - 0.004) \div \text{蛋白浓度}$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$NADK (U/g \text{ 鲜重}) = 406 \times (\Delta A - 0.004) \div \text{样本鲜重}$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟产生 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$NADK (U/10^4 \text{ cell}) = 406 \times (\Delta A - 0.004) \div \text{细菌或细胞密度}$

（4）按照液体体积计算

单位的定义：每 ml 液体在反应体系中每分钟产生 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$NADK (U/ml) = 406 \times (\Delta A - 0.004)$