

NAD 激酶(NADK) 试剂盒说明书

(货号: PB1025W96 微量法 96 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⁺磷酸化生成 NADP⁺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⁺磷酸化, 生成 NADP⁺; NADP⁺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/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100 mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体 10 mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体 25 mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃保存;

试剂四: 粉剂×1 瓶, -20℃保存;

试剂五: 粉剂×1 瓶, -20℃避光保存;

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 500 万细菌或细胞加入 1mL 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

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。

2、将试剂一和试剂二 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 15min 以上。

3、工作液 I 的配制: 在试剂三中加入 8mL 试剂一, 充分混匀待用。

工作液 II 的配制: 在试剂四中加入 11mL 试剂二, 充分混匀, 使用前

工作液 III 的配制: 在试剂五中加入 11mL 试剂二, 充分混匀待用。

4、加样表

试剂名称(μL)	测定孔
样本	20

工作液 I	80
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）冰浴冷却，10000g，室温离心 10min，取上清	
上清液	25
工作液 II	110
工作液 III	110

加完试剂混匀后立即在 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：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（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。

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

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

（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。

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

（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。

$$\text{NADK (U/10}^4 \text{ cell)} = 406 \times (\Delta A - 0.004) \div (500 \div V \text{ 样总}) = 0.812 \times (\Delta A - 0.004)$$

（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。

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

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL； W: 样品质量，g； V 样总：加入提取液体积，1mL； 500: 细胞或细菌总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

（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。

$$\text{NADK (U/mg prot)} = 203 \times (\Delta A - 0.004) \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

（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。

$$\text{NADK (U/g 鲜重)} = 203 \times (\Delta A - 0.004) \div (W \div V \text{ 样总}) = 203 \times (\Delta A - 0.004) \div W$$

（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。

$$\text{NADK (U/10}^4 \text{ cell)} = 203 \times (\Delta A - 0.004) \div (500 \div V \text{ 样总}) = 0.406 \times (\Delta A - 0.004)$$

（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。

$$\text{NADK (U/ml)} = 203 \times (\Delta A - 0.004)$$



Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。