

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0471

Size: 100T/96S

NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 °C保存	
试剂四	粉剂×1 瓶	-20 °C保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	-20 °C保存	

五、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:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例(建议500万细菌或细胞加入1mL提取液),超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率20%或200W,超声3s,间隔10s,重复30次);8000g 4℃离心10min,取上清,置冰上待测。

组织:按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例(建议称取约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。

六、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;现配现用;

工作液II的配制:在试剂四中加入11mL试剂二,充分混匀待用;用不完的试剂4℃保存一周;

工作液Ⅲ的配制:在试剂五中加入 11mL 试剂二,充分混匀待用;用不完的试剂 4℃保存一周;

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, 25℃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

$$\Delta A = A2 - A1$$

七、NADK 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.002463x + 0.004$; x 为 NADP 标准品浓度(nmol/mL), y 为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADK (nmol/min/mg prot)} &= [406 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 135.3 \times (\Delta A - 0.004) \div Cpr \end{aligned}$$

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 组织每分钟产生 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min/g 鲜重)} = [406 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T$$
$$= 135.3 \times (\Delta A - 0.004) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [406 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T$$
$$= 0.271 \times (\Delta A - 0.004)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.02mL；V2：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.001232x + 0.004$ ；x 为 NADP 标准品浓度(nmol/mL)，y 为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min/mg prot)} = [812 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T$$
$$= 270.6 \times (\Delta A - 0.004) \div Cpr$$

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 组织每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min/g 鲜重)} = [812 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T$$
$$= 270.6 \times (\Delta A - 0.004) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADK (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [812 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T \\ &= 0.542 \times (\Delta A - 0.004) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 3min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g;; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。