

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-S0751

Size: 50T/48S

NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*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、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。

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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 50mL×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℃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 16mL 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 22mL 试剂二，充分混匀待用；溶解后 4℃保存一周。

工作液 III 的配制：在试剂五中加入 22mL 试剂二，充分混匀待用；溶解后 4℃保存一周。

4、加样表

试剂名称 (μL)	测定孔
样本	80
工作液 I	320

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	100
工作液 II	440
工作液 III	440

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：

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。

$$\text{NADK (nmol/min /mg prot)} = [406 \times (\Delta A - 0.004) \times V1] \div (V1 \times C_{pr}) \div T$$

$$= 135.3 \times (\Delta A - 0.004) \div C_{pr}$$

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。

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

(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。

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

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.08mL; 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