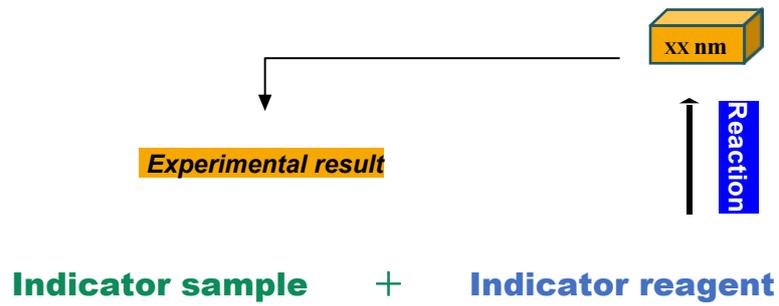


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

NAD激酶 (NAD kinase, NADK) 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

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唯一能够催化 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：

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℃保存	-
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃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：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。

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°C（哺乳动物）或 25°C（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°C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°C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°C（哺乳动物）或 25°C（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°C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 $\Delta A = A2 - A1$

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。

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

$$= 135.3 \times (\Delta A - 0.004) \div Cpr$$

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。

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

(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。

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

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。