

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

货号：ZC-S0751

规格：50 管/48 样

NAD 激酶 (NAD kinase, NADK) 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

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、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：

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	-

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°C 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 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°C 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°C 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°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	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 $\Delta A = A2 - A1$

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。

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

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

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 1 nmol 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, 0.08mL; 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