

NAD 激酶 (NAD kinase, NADK) 试剂盒说明书

(货号: G0854W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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, 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。

NADK 催化 NAD⁺ 磷酸化生成 NADP⁺; 接着在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖作用下, 使 NADP⁺ 还原成 NADPH。通过检测 NADPH 在 340 nm 下的增加速率。可得出 NADK 酶活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温台式离心机、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、NAD 激酶 (NADK) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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, 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次); 4℃×12000g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例进行提取

③ 液体样本: 直接检测, 若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)

③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀, 25°C下孵育 5-10min	
试剂四	10
混匀, 25°C下立即于 340nm 处读取 A1, 2min 后读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】** 1. 若 A2 值大于 1.5, 则可减少样本上样量 V1 (如减至 5 μL, 则试剂三相应增加), 或缩短反应时间 T (如缩至 1min 或更短), 则改变后的加样量 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。
2. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可增加样本量 (如增至 20 μL, 则试剂三相应减少), 或增加反应时间 T (如增至 5min 或更长)。则改变后的加样量 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 3.22 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \div T = 3.22 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.006 \times \Delta A$$

4、按液体样本计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V1 \div T = 3.22 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 2 min;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。