



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

NAD激酶检测试剂盒（微量法）

货号: R42018

规格: 100T/48S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES378	100mL×1瓶	4℃保存;
试剂-A	10 mL×1瓶	4℃保存;
试剂-B	25 mL×1瓶	4℃保存;
试剂-C	粉剂×1瓶	-20℃保存;
试剂-D	粉剂×1瓶	-20℃保存;

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

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。

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; 在 340 nm 下测定NADPH 增加速率。可反映出 NADK 活性的大小。

自备用品:

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。

样本前处理:



1. 细菌、细胞样品的制备:

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): ES378 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES378), 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。

2. 组织样品的制备:

组织: 按照组织质量 (g): ES378 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES378), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 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 340nm, 蒸馏水调零。

2. 将 试剂-A 和 试剂-B 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-C 中加入 5mL 试剂-A, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;

工作液II的配制: 在 试剂-D 中加入 18mL 试剂-B, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;

4. 操作表 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入):

试剂名称	测定管(μL)	对照管(μL)
样本	20	20
工作液I	80	
试剂-A		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	40	40
工作液II	160	160
加完试剂混匀, 室温静置15min,340nm下测定吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

NADK 活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:



1. 血清（浆）NADK 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟生成 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 53.59 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADK 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

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

$$\text{NADK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div W$$

（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生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.107 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积，1×10⁻⁴ L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入 ES378 体积，1 mL；T：反应时间，15 min；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下：

1. 血清（浆）NADK 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟生成 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 107.18 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 NADK 活力的计算：



(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{NADK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div W$$

(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生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.214 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm; d : 96 孔板光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 ES378 体积, 1 mL; T : 反应时间, 15 min; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit。