

# NAD 激酶 (NAD kinase, NADK) 试剂盒说明书

(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惟一能够催化 NAD<sup>+</sup>磷酸化生成 NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>磷酸化生成 NADP<sup>+</sup>;接着在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖作用下,使 NADP<sup>+</sup>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   | 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(10<sup>4</sup>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℃下孵育 5-10min                               |     |
| 试剂四                                              | 10  |
| 混匀, 25℃下立即于 340nm 处读取 A1, 2min 后读取 A2, ΔA=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。

$$\text{NADK} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 3.22 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 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。

$$\text{NADK} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 3.22 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$\text{NADK} (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.006 \times \Delta A$$

### 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。

$$\text{NADK} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V_1 \div T = 3.22 \times \Delta A$$

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。