



NAD 激酶 (NAD Kinase, NADK) 试剂盒说明书(精简版)

(货号: A117-1-1 50T/24 样)

一、测定意义

NADK (EC2.7.1.23) 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, NADK 在合成 NADP(H)以及调节 NAD(H)与 NADP(H)的平衡上具有重要作用。

二、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; 通过在 340nm 下测定 NADPH 的增加速率可反映出 NADK 活性的大小。

三、自备实验用品及仪器。

水浴锅、离心机、可见分光光度计、1 mL 石英比色皿、可调式移液枪和蒸馏水。

四、试剂组成和配制(试剂盒有效期 3 个月)

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 溶剂 25mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 溶剂 50mL×1 支, 4°C 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存;

试剂四: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存。

五、样品测定的准备

1. 细菌或细胞样品的制备:

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 (10⁴ 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 组织样品的制备:

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。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

六、测定步骤

- 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;
- 将溶剂一与溶剂二在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 水浴 15min 以上;
- 工作液 I 的配制: 在试剂三中加入 12mL 溶剂一, 充分混匀待用; 现配现用;
工作液 II 的配制: 在试剂四中加入 45mL 溶剂二, 充分混匀待用, 现配现用。
- 加样表

试剂 (μL)	测定孔	对照孔
样本	100	100
工作液 I	400	
试剂一		400
充分混匀, 在 37° C (哺乳动物) 或 25° C (其他物种) 水浴 15min, 立即煮沸 2min (盖紧以防水分流失), 并与冷却, 1000g, 室温离心 10min, 取上清		
上清液	200	200
工作液 II	800	800
加完试剂混匀后, 室温静置 15 分钟在 340nm 下测定 30 秒的吸光值, 计算 ΔA=A _{测定} -A _{对照} 。		

七、NADK 活性计算公式

1. 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmolNADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADK 活力} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} \\ &= 53.59 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按组织质量计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmolNADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADK 活力} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \times V_{\text{样总}}}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} \\ &= 53.59 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3. 按细菌或细胞密度计算

单位定义: 每 1 万个细菌或者细胞每分钟催化产生 1nmolNADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADK 活力} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \times V_{\text{样总}}}{500 \times \epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} \\ &= 0.107 \times \Delta A \end{aligned}$$

4. 按照样本体积计算 (如血清浆)

单位定义: 每 ml 样本每分钟催化产生 1nmolNADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADK 活力} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} \\ &= 53.59 \times \Delta A \end{aligned}$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 5*10⁴;

V_{样总}: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 15min;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

500: 细胞或细菌总数, 500 万。