

NAD 激酶（NADK）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1035

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂七	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂八	液体 14 μL×1 瓶	2-8℃保存
试剂九	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂十	液体 40 mL×1 瓶（自备）	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：用时加入 3 mL 蒸馏水，充分溶解，可分装保存，-20℃保存两周，禁止反复冻融；临用前取出一支稀释 100 倍使用。
- 2、试剂四：用时加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，2-8℃保存；
- 3、试剂五：用时加入 2 mL 蒸馏水，充分溶解，2-8℃保存；
- 4、试剂六：用时加入 2 mL 蒸馏水，充分溶解，2-8℃保存；
- 5、试剂七：用时加入 2 mL 蒸馏水，充分溶解，2-8℃避光保存；
- 6、试剂八：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前加入 0.986 mL 蒸馏水充分溶解，可分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 7、试剂十：自备 95%乙醇；
- 8、标准品：加入 1.9 mL 蒸馏水，即得 2 μmol/mL NADP 标品。临用前稀释 100 倍得 20 nmol/mL NADP 标准溶液备用。

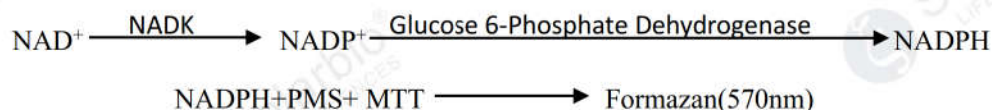
产品说明：

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，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。





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), 通过其在 570nm 的吸光值大小可反映出 NADK 活性的大小。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、无水乙醇 (>98%, AR)、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 1、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℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 2、细胞、细菌: 按照细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 200w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 等液体样本: 直接测定。(若溶液有浑浊, 则离心后进行测定)

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 570nm, 可见分光光度计 95% 乙醇调零。
- 2、标准品的配制: 按下表混合试剂三和标准品配制标准品

序号	标准品 (μL)	试剂三 (μL)	标准管浓度 (nmol/mL)
1	0	50	0
2	5	45	2
3	10	40	4
4	15	35	6
5	20	30	8
6	25	25	10
7	30	20	12
8	35	15	14

下述实验中每个标准管需 10 μL 标准溶液 (注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度)。

3、操作表: (在 EP 管中操作)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	10	10	-	-
标准品	-	-	10	-
蒸馏水	-	-	-	10
试剂一	14	24	24	24
试剂三	10	-	-	-
试剂四	6	6	6	6



充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15min，立即煮沸 2min（缠封口膜，防止爆盖）。之后 10000rpm 常温离心 5min，取 20μL 上清于 1.5mL EP 管中，继续加入下列试剂。				
试剂二	50	50	50	50
试剂五	15	15	15	15
试剂六	15	15	15	15
试剂七	15	15	15	15
试剂八	7	7	7	7
室温避光静置 20min。				
试剂九	100	100	100	100
混匀静置 5min，15000g，常温离心 10min。去上清，留沉淀。				
试剂十	200	200	200	200

充分溶解沉淀后，放于微量比色皿或 96 孔板中在 570nm 下测定吸光值，分别记为 A 测定，A 对照，A 标准，A 空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标曲只需测定 1-2 次

三、NADK 活性计算

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，nmol/mL）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 x（nmol/mL）。

2、NADK 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 0.067 \times x \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.067 \times x \div W$$

（3）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样本}} \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T = x \times 1.33 \times 10^{-4}$$

（4）按血清（浆）体积计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/mL)} = x \div T = 0.067 \times x$$

V 样本：加入样本体积，0.01mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 提取：加入的提取液体积，1mL；500：细菌或细胞总数，500 万；T：反应时间，15min。

注意事项：

1. 样本的处理必须在 0℃-4℃ 中操作完成，以防止酶变性失活。建议在正式实验前，选取差别较大的两个样本进行预实验。
2. 试剂三、四、五、六、七、八在测定过程中都必须在冰上放置。
3. 当初始吸光值大于 0.4 时，建议将样本用 PBS 稀释后测量。
4. 若测量样本数量过多，可以将试剂二、五、六、七按比例配成工作液使用。





实验实例:

1、取 0.1 大鼠肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 A 测定=0.260, A 对照=0.125, 计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.260-0.125=0.135, 带入标准曲线 $y=0.0994x-0.0429$, 计算 $x=(0.135+0.0429)/0.0994=1.7897$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{NADK (U/g 质量)} = 0.067 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 0.067 \times 1.7897 \div 0.1 \times 2 = 2.3982 \text{ U/g 质量}。$$

2、取小鼠血浆稀释 2 倍直接检测, 使用 96 孔板测得 A 测定=0.093, A 对照=0.076, 计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.093-0.076=0.017, 带入标准曲线 $y=0.0994x-0.0429$, 计算 $x=(0.017+0.0429)/0.0994=0.6026$, 按血浆体积计算酶活得:

$$\text{NADK (U/mL)} = 0.067 \times x \times \text{稀释倍数} = 0.067 \times 0.6026 \times 2 = 0.0808 \text{ U/mL}。$$

参考文献:

[1] Pollak N, Niere M, Ziegler M. NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(46): 33562-33571.

相关系列产品:

BC0310/BC0315 辅酶I NAD(H)含量检测试剂盒

BC1040/BC1045 NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒

BC1050/BC1055 NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 活性检测试剂盒

BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒

