

NAD 激酶 (NAD kinase, NADK) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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)]作为磷酰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。

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

组成:

产品名称	CE013-50T/24S	Storage
提取液: 液体	50 ml	4°C
试剂一: 液体	25ml	4°C
试剂二: 液体	50 ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿和蒸馏水。

样本测定的准备:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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 (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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。



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、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、将试剂一和试剂二 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 15min 以上。
- 3、工作液I的配制: 在试剂三中加入 12ml 试剂一, 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: 在试剂四中加入 45ml 试剂二, 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、加样表

试剂名称(μl)	测定孔	对照管
样本	100	100
工作液I	400	
试剂一		400
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	200	200
工作液II	800	800

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:

- 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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 5×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.1 ml; V 样总: 加入提取液体积, 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。

