

NAD激酶（NAD kinase, NADK）试剂盒说明书

微量法100管/48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。

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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100 mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体10 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体25 mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃保存；

试剂四：粉剂×1瓶，-20℃保存；

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℃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。

NAD激酶（NAD kinase, NADK）试剂盒说明书测定步骤

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、将试剂一和试剂二37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）水浴15min以上。

3、工作液I的配制：在试剂三中加入5mL试剂一，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融；

工作液II的配制：在试剂四中加入18mL试剂二，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20°C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	20	20
工作液I	80	
试剂一		80

充分混匀，37°C（哺乳动物）或25°C（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°C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.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。

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

V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：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02 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。

b.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。

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

V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样：加入样本体积，0.02 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。