

## NAD 激酶（NADK）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1229

产品规格：100管/48样

### 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唯一能够催化NAD<sup>+</sup>磷酸化生成NADP<sup>+</sup>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。

NADK催化NAD<sup>+</sup>磷酸化，生成NADP<sup>+</sup>；NADP<sup>+</sup>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。**

### 产品内容：

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

### 溶液的配制：

1. 试剂三：用时加入3mL双蒸水，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1mL双蒸水，充分溶解，4℃保存；
3. 试剂五：用时每瓶加入2mL双蒸水，充分溶解，4℃保存；
4. 试剂六：用时加入2mL双蒸水，充分溶解，4℃保存；
5. 试剂七：用时加入2mL双蒸水，充分溶解，4℃避光保存；
6. 试剂八：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前加入0.986mL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1.9mL蒸馏水，即得2μmol/mL NADP标品。临用前稀释100倍得20nmol/mL NADP标准溶液备用。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

### 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、无水乙醇、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. 细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，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：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。

#### 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，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

标准品（ $\mu\text{L}$ ）	试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	标准管浓度（nmol/mL）
0	50	0
5	45	2
10	40	4
15	35	6
20	30	8
25	25	10
30	20	12
35	15	14

##### 3. 操作表：（在EP管中操作）

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	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（盖紧，防止水分散失）。之后10000rpm常温离心5min，取20 $\mu\text{L}$ 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	500
混匀静置 5min，20000g，常温离心5min。去上清，留沉淀。				



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

### 三、NADK活性计算：

#### 1. 标准曲线的绘制：

以NADP标准品浓度为x轴， $\Delta A_{标准}$  为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ 。将 $\Delta A_{测定}$  带入公式得到 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1 nmol NADP定义为一个酶活力单位。

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

##### (2) 按样本鲜重计算：

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

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

##### (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；； Cpr：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，建议将样品用PBS稀释后测量。
4. 若测量样品数量过多，可以将试剂二、五、六、七按比例配成工作液使用。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com