

NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1228

产品规格: 50管/24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⁺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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体25mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	粉剂×2瓶	-20℃
试剂六	粉剂×1瓶	-20℃
试剂七	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂八	液体42 μL×1瓶	2-8℃
试剂九	液体50 mL×1瓶	2-8℃
试剂十	液体100 mL×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3.75mL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2.5mL双蒸水, 充分溶解, 4℃保存;
3. 试剂五: 用时每瓶加入3mL双蒸水, 充分溶解, 4℃保存;
4. 试剂六: 用时加入6mL双蒸水, 充分溶解, 4℃保存;
5. 试剂七: 用时加入6mL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3mL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。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、无水乙醇、冰和蒸馏水。



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

操作步骤:

一、粗酶液提取:

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. 可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至570nm, 95%乙醇调零。

2. 标准品的配制: 在1.5mLEP管中按下表混合试剂三和标准品配制标准品

标准品 (μL)	试剂三 (μL)	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 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样品	50	50	-	-
标准品	-	-	50	-
蒸馏水	-	-	-	50
试剂一	70	120	120	120
试剂三	50	-	-	-
试剂四	30	30	30	30
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 μL上清于1.5mL EP管中, 继续加入下列试剂。				
试剂二	250	250	250	250
试剂五	75	75	75	75
试剂六	75	75	75	75
试剂七	75	75	75	75
试剂八	35	35	35	35
室温避光静置20min,				
试剂九	500	500	500	500
混匀静置 5min, 20000g, 常温离心5min。去上清, 留沉淀。				
试剂十	1000	1000	1000	1000

充分溶解沉淀后, 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 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。



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

三、NADK活性计算：

1. 标准曲线的绘制：

以NADP标准品浓度为x轴， ΔA 标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 测定带入公式得到x (nmol/mL)。

2. NADK活力的计算：

1、组织中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；0.05mL；V提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万；T：反应时间，15min。

注意事项：

1. 粗酶液的提取必须在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0.6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

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com