

NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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。

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℃（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 5mL 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 18mL 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	20	20
工作液 I	80	
试剂一		80

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	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。

$$\text{NADK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{NADK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div W$$

(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。