

NAD 激酶（NADK）检测试剂盒（分光光度法）

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 50 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 25 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 50 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°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	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。

$$\begin{aligned} \text{NADK (nmol/min/mL)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 53.59 \times \Delta A \end{aligned}$$

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。