

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 (10^4 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。

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

(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，1×10⁴ L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。

$$\text{NADK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{NADK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div W$$

(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。