

NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1000

保存: -20°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/24S 96T/48S

适用样本: 血清(浆)、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

NAD 激酶 (NAD⁺ Kinase, NADK, EC 2.7.1.23) 广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中, 是目前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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 NADK 的活性水平。其原理是在测定中, 样本中存在的 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 在 340nm 处有特征吸收峰, 通过在 340nm 下测定 NADPH 增加速度 (吸光值的变化) 可反映出 NADK 活性。

产品内容

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|-------|--------|-------|------------|
| | 48 T | 96 T | |
| 提取液 | 50mL | 100mL | 4°C 保存 |
| 试剂一 | 5mL | 10mL | 4°C 保存 |
| 试剂二 | 12.5mL | 25mL | 4°C 保存 |
| 试剂三 | 1 | 1 | -20°C 避光保存 |
| 试剂四 | 1 | 1 | -20°C 避光保存 |

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340nm 处的吸光度) 及水浴锅

96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

提取液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂三: 48T 在试剂三中加入 2.5mL 试剂一, 96T 在试剂三中加入 5mL 试剂一, 充分混匀待用, 使用前配制。未使用的试剂分装后 -20°C 避光保存, 避免反复冻融。

试剂四: 48T 在试剂四中加入 9mL 试剂二, 96T 在试剂四中加入 18mL 试剂二, 充分混匀待用, 使用前配制。未使用的试剂分装后 -20°C 避光保存, 避免反复冻融。

注意: 试剂三、试剂四在测定过程中都必须在冰上放置。

样本制备

血浆和血清样本: 可直接检测。

组织样本: 用冷的 PBS 冲洗组织去除组织表面的血液。称取 0.1g 组织加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。匀浆液于 4°C, 8,000g 离心 10min。取上清, 置于冰上待测。

产品说明书

细胞和细菌样本：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，低速 600g 离心 5min，弃上清液，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 4℃，8,000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

注意：样品处理等过程均需要在冰上进行，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm。紫外分光光度计去离子水调零。
2. 将试剂三和试剂四 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15min 以上。
3. 设置测定管和对照管，按照如下方式加样（在 EP 管中操作）：

| 试剂 | 对照管 (μ L) | 测定管 (μ L) |
|-----|-----------|-----------|
| 样本 | 20 | 20 |
| 试剂三 | 0 | 80 |
| 试剂一 | 80 | 0 |

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，12,000 g，室温离心 10min。

4. 取各管中上清 40μ L 加入 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中，分别加入试剂四 160μ L，迅速混匀。室温静置 15min，测定 340nm 处吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

注意：每个样本均需要做对照管。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 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量，如果 $A_{\text{测定}}$ 大于 2.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。

结果计算

NADK 活性的计算：

A. 用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下：

1、血清（浆）NADK 活性的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 107.18 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 NADK 活性的计算：

（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生成 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

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

（2）按样本鲜重计算：

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

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

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/10}^4 \text{ Cells)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.214 \times \Delta A$$

$V_{\text{反应}}$ ：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，0.5 cm； 10^9 ：1 mol= 10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，15 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万个。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm 调整为 d ：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。

产品说明书

5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK0999 辅酶 I NAD(H) 检测试剂盒（微量法）

PMK1004 NADH 氧化酶（NOX）检测试剂盒（微量法）

PMK1005 柠檬酸合酶（CS）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

