

NAD 激酶（NAD kinase, NADK）试剂盒说明书

（货号：BP10444W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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，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⁺；接着在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖作用下，使 NADP⁺还原成 NADPH。通过检测 NADPH 在 340 nm 下的增加速率。可得出 NADK 酶活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解，可分装冻存。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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，300W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）；4℃×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000:1 比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测，若浑浊则离心后取上清液检测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）
- ③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂组分（μL）	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀，25℃下孵育 5-10min	
试剂四	10
混匀，25℃下立即于 340nm 处读取 A1，2min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1. 若 A2 值大于 1.5，则可减少样本上样量 V1（如减至 5μL，则试剂三相应增加），或缩短反应时间 T（如缩至 1min 或更短），则改变后的加样量 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。 2. 若 ΔA 在零附近徘徊，可增加样本量（如增至 20μL，则试剂三相应减少），或增加反应时间 T（如增至 5min 或更长）。则改变后的加样量 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 3.22 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \div T = 3.22 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.006 \times \Delta A$$

4、按液体样本计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟生成 1μmol 的 NADP⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V1 \div T = 3.22 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；
 d ---96 孔板光径，0.5cm；
 V ---加入提取液体积，1 mL；
 $V1$ ---加入样本体积，0.01 mL；
 $V2$ ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；
 T ---反应时间，2 min；
 W ---样本质量，g；
 500 ---细菌或细胞总数，万；
 Cpr ---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。