

NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10228

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂五	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂六	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂七	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂八	液体 42 μL×1 瓶	4°C保存
试剂九	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂十	液体 100 mL×1 瓶 (自备)	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：用时加入 3.75mL 双蒸水，充分溶解，可分装保存，-20°C保存两周，禁止反复冻融；临用前取出一支稀释 100 倍使用。
- 2、试剂四：用时加入 2.5 mL 双蒸水，充分溶解，4°C保存；
- 3、试剂五：用时每瓶加入 3 mL 双蒸水，充分溶解，4°C保存；
- 4、试剂六：用时加入 6 mL 双蒸水，充分溶解，4°C保存；
- 5、试剂七：用时加入 6 mL 双蒸水，充分溶解，4°C避光保存；
- 6、试剂八：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解，可分装后-20°C保存，禁止反复冻融；
- 7、试剂十：自备 95%乙醇；
- 8、标准品：加入 1.9 mL 蒸馏水，即得 2 μmol/mL NADP 标品。临用前稀释 100 倍得 20 nmol/mL NADP 标准溶液备用。

产品说明：

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。

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 通过 PMS 的递氢作用, 还原氧化型噻唑蓝 (MTT), 通过其在 570nm 的吸光值大小可反映出 NADK 活性的大小。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、无水乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、 细菌、细胞或组织样本的制备:

细菌或培养细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 弃上清, 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆; 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样本: 直接检测。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 570nm, 95%乙醇调零。

2、标准品的配制: 在 1.5mLEP 管中按下表混合试剂三和标准品配制标准品

标准品 (μL)	试剂三 (μL)	标准管浓度 (nmol/mL)
0	50	0
5	45	2
10	40	4
15	35	6
20	30	8
25	25	10
30	20	12
35	15	14

3、操作表 (在 1.5mLEP 管中操作):

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	50	50	-	-
标准品	-	-	50	-
蒸馏水	-	-	-	50
试剂一	70	120	120	120
试剂三	50	-	-	-
试剂四	30	30	30	30
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)。之后 10000rpm 常温离心 5min, 取 100μL 上清于 1.5mL EP 管中, 继续加入下列试剂。				
试剂二	250	250	250	250
试剂五	75	75	75	75

试剂六	75	75	75	75
试剂七	75	75	75	75
试剂八	35	35	35	35
室温避光静置 20min,				
试剂九	500	500	500	500
混匀后静置 5min, 15000g, 常温离心 10min。去上清, 留沉淀。				
试剂十	1mL	1mL	1mL	1mL

充分溶解沉淀后, 在 570nm 下测定吸光值, 分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白, 计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照, ΔA 标准=A 标准-A 空白。

三、NADK 活性计算

1、标准曲线的绘制:

以 NADP 标准品浓度为 x 轴, ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准曲线 $y=kx+b$ 。将 ΔA 测定带入公式得到 x (nmol/mL)。

2、NADK 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/mg prot)} = x \times V \text{ 样本} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样本}) \div T = 0.067 \times x \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算:

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

$$\text{NADK (U/g 质量)} = x \times V \text{ 样本} \div (\text{W} \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T = 0.067 \times x \div \text{W}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

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

$$\text{NADK (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V \text{ 样本} \div (500 \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T = x \times 1.33 \times 10^{-4}$$

(4) 按血清(浆)体积计算:

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

$$\text{NADK (U/mL)} = x \div T = 0.067 \times x$$

V 样本: 加入样本体积, 0.05mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; T: 反应时间, 15min。

注意事项:

- 1、样本的处理必须在 0°C-4°C 中操作完成, 以防止酶变性失活。建议在正式实验前, 选取差别较大的两个样本进行预实验。
- 2、试剂三、四、五、六、七、八在测定过程中都必须在冰上放置。
- 3、当初始吸光值大于 0.6 时, 建议将样本用 PBS 稀释后测量。
- 4、若测量样本数量过多, 可以将试剂二、五、六、七按比例配成工作液使用。

实验实例:

1、取 0.1 大鼠肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作,测得 A 测定=0.455, A 对照=0.213, 计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.455-0.213=0.242, 带入标准曲线 $y=0.1662x-0.0343$, 计算 $x=(0.242+0.0343)/0.1662=1.66$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{NADK (U/g 质量)} = 0.067 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 0.067 \times 1.66 \div 0.1 \times 2 = 2.22 \text{ U/g 质量}。$$

2、取小鼠血浆直接检测,测得 A 测定=0.131, A 对照=0.094, 计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.131-0.094=0.037, 带入标准曲线 $y=0.1662x-0.0343$, 计算 $x=(0.037+0.0343)/0.1662=0.429$, 按血浆体积计算酶活得:

$$\text{NADK (U/mL)} = 0.067 \times x = 0.067 \times 0.429 = 0.028 \text{ U/mL}。$$

参考文献:

[1] Pollak N, Niere M, Ziegler M. NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(46): 33562-33571.