



NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
NAD Kinase (NADK) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒

NAD Kinase (NADK) Activity Assay Kit

一、产品描述

NAD 激酶广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中，能够以 ATP 或无机多聚磷酸作为磷酸基供体催化 NAD(H) 进行磷酸化反应生成 NADP(H)，在合成 NADP(H) 以及调节 NAD(H) 与 NADP(H) 的平衡方面具有重要作用。

NAD 激酶能够催化 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) 生成紫色物质，产物在 570 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征 NAD 激酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存两周，避免反复冻融)
试剂三应用液	-	-	使用前将试剂三蒸馏水稀释 100 倍 (根据使用量现用现配)
试剂四	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解
试剂六	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解
试剂七	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解
试剂八	液体 14 μL ×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 986 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存两周，避免反复冻融)
试剂九	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂十	液体 40 mL×1 瓶 (自备试剂)	4°C 保存	95% (v/v) 乙醇溶液 (95 mL 无水乙醇+5 mL 蒸馏水)
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1.9 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ NADP 标准液)
标准稀释液的配置：使用前将 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ NADP 标准液使用试剂三应用液稀释至 14、12、10、8、6、4、2 nmol/mL 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4°C 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，试剂十调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
粗酶液	10	10	-	-
标准稀释液	-	-	10	-
蒸馏水	-	-	-	10
试剂一	14	24	24	24
试剂三应用液	10	-	-	-
试剂四	6	6	6	6
37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴 15min 立即沸水浴处理 2 min（密封以防止水分散失），冷却至室温 10000 g 常温离心 5 min，取上清				
上清液	20	20	20	20
试剂二	50	50	50	50
试剂五	15	15	15	15
试剂六	15	15	15	15
试剂七	15	15	15	15
试剂八	7	7	7	7
室温避光静置 20 min				
试剂九	100	100	100	100
充分混匀，室温静置 5 min 15000 g 常温离心 10 min，弃上清，留沉淀				
试剂十	200	200	200	200

吸光值测定：沉淀充分溶解后，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需一个对照管。

标准曲线的建立：以 14、12、10、8、6、4、2 nmol/mL 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x (nmol/mL)。

3. NAD 激酶 (NADK) 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{NADK (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{样}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.067 \times x}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{NADK (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{提}}}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.067 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{提}}}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.067 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

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

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，15 min。

四、注意事项

①粗酶液制备过程须在 0°C - 4°C 条件下完成，以防止酶变性失活，且试剂三、四、五、六、七、八使用过程中须在冰上放置；

②若测定吸光值大于 0.35 时，建议将粗酶液使用 PBS 适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

