



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 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	使用前加入 3.75 mL 蒸馏水充分溶解 分装后-20°C 可保存两周，避免反复冻融 使用前使用蒸馏水稀释 100 倍即为试剂三应用液
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解
试剂五	粉剂×2 瓶	-20°C 保存	使用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水充分溶解
试剂六	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解
试剂七	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解
试剂八	液体 42 μL×1 瓶	4°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)
试剂九	液体 50 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂十	液体 100 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 μmol/mL NADP 标准液)
标准稀释液的配制： 使用前将 2 μmol/mL NADP 标准液使用试剂三应用液稀释至 14、12、10、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℃ 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℃ 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	50	50	-	-
标准稀释液	-	-	50	
蒸馏水	-	-	-	50
试剂一	70	120	120	120
试剂三应用液	50	-	-	-
试剂四	30	30	30	30
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15min 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	100	100	100	100
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 20 min				
试剂九	500	500	500	500
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	1000	1000	1000	1000

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、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，0.05 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 0.6 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。

