

NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1229

产品规格: 100管/48样

产品简介:

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, 可催化NAD(H)以ATP或无机多聚磷酸[poly(P)]作为磷酰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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六	粉剂×1瓶	-20℃
试剂七	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂八	液体14μL×1瓶	2-8℃
试剂九	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂十	液体40mL×1瓶 (自备)	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂三: 用时加入3mL双蒸水, 充分溶解, 可分装保存, -20℃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1mL双蒸水, 充分溶解, 4℃保存;
3. 试剂五: 用时每瓶加入2mL双蒸水, 充分溶解, 4℃保存;
4. 试剂六: 用时加入2mL双蒸水, 充分溶解, 4℃保存;
5. 试剂七: 用时加入2mL双蒸水, 充分溶解, 4℃避光保存;
6. 试剂八: 液体置于试剂瓶内EP管中。临用前加入0.986mL蒸馏水充分溶解, 可分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
7. 试剂十: 自备95%乙醇;
8. 标准品: 加入1.9mL蒸馏水, 即得2μmol/mL NADP标品。临用前稀释100倍得20nmol/mL NADP标准溶液备用。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

需自备的仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、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、细胞或组织样品的制备：

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℃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℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2. 血清（浆）样品：直接检测。
二、测定步骤：
1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至570nm，95%乙醇调零。
2. 标准品的配制：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EP管中操作）

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	10	10	-	-
标准品	-	-	10	-
蒸馏水	-	-	-	10
试剂一	14	24	24	24
试剂三	10	-	-	-
试剂四	6	6	6	6
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）。之后10000rpm常温离心5min，取20 μL 上清于1.5mL EP管中，继续加入下列试剂。				
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20min				
试剂九	100	100	100	500



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

混匀静置 5min, 20000g, 常温离心5min。去上清, 留沉淀。				
试剂十	200	200	200	200

充分溶解沉淀后, 放于微量比色皿或96孔板中在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, 得到标准方程 $y=kx+b$ 。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1 nmol 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) 按样本鲜重计算:

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

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

(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: 0.01mL; ; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V提取: 加入的提取液 体积, 1mL; 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℃-4℃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0.4时, 建议将样品用PBS稀释后测量。
4. 若测量样品数量过多, 可以将试剂二、五、六、七按比例配成工作液使用。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com