

CheKine™ NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1022

规格: 48 T/24 S 96 T/48 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 血清 (浆)、动植物组织、细胞或细菌
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

NAD 激酶 (NADK, EC 2.7.1.23) 广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中, 是目前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, NADK 在合成 NADP(H)以及调节 NAD(H)与 NADP(H)的平衡上具有重要作用。

本试剂盒检测原理是样本中存在的 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 在 340 nm 处有特征吸收峰, 通过在 340 nm 下测定 NADPH 增加速度 (吸光值的变化) 可反映出 NADK 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60×2 mL	4℃
Assay Buffer I	6 mL	12 mL	4℃
Assay Buffer II	15 mL	30 mL	4℃
Substrate Mix	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
Enzyme Mix	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS	清洗样本用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Assay Buffer I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Assay Buffer II	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent I	临用前配制；在 Substrate Mix 中加入 3 mL (48 T)/ 6 mL (96 T) Assay Buffer I，充分混匀待用	未用完的试剂-20℃分装避光可保存 1 周，避免反复冻融
Working Reagent II	临用前配制；在 Enzyme Mix 中加入 12.6 mL (48 T)/ 25.2 mL (96 T) Assay Buffer II，充分混匀待用	未用完的试剂-20℃分装避光可保存 1 周，避免反复冻融

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。

- **动植物组织**：用冷的 PBS 冲洗组织去除组织表面的血液或杂质，称取约 0.1 g 组织样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清液。加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。

- 血清（浆）：可直接检测。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。
2. 将 Assay Buffer I 置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15 min 以上。
3. 检测体系配制：在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作：（每个测定管需设一个对照管）

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
样本	20	20
Working Reagent I	80	0
Assay Buffer I	0	80

4. 充分混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 15 min，立即煮沸 2 min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却，10000 g，室温离心 10 min，取各管中上清 40 μL 加入 96 孔 UV 板中，分别加入 Working Reagent II 160 μL，迅速混匀，室温静置 15 min。
5. 吸光度检测：于 340 nm 处测定吸光值，分别记为 $A_{\text{测定}}$ 和 $A_{\text{对照}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

2. NADK 活性的计算：

- 按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/g)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div W$$

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

- 按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：每 1 万个细胞或细菌每分钟生成 1 nmol NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/10}^4\text{)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div N$$

- 按血清（浆）体积计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟生成 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 107.18 \times \Delta A$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 1×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； 10^9 ：1 mol = 10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL； T ：反应时间，15 min； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； N ：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细菌数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）。

07 结果展示

示例-1: 取 0.1 g 玉米种子使用 96 孔 UV 板测得计算 $\Delta A = 0.210 - 0.052 = 0.158$, 按样本质量计算含量得: NADK (U/g) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div W = 169.34$ U/g。

08 FAQ

- 检测得到的样本 ΔA 过高或者过低怎么办?

如果样本 $\Delta A > 2.0$, 样本需用 Extraction Buffer 适当稀释或减少提取用样本量, 重新进行测定。如果样本的 $\Delta A < 0.01$, 可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1020	CheKine™ 辅酶 I NAD(H)含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1021	CheKine™ NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ NAD激酶（NADK）活性检测流程示意图

(AbbKine 货号：KTB1022)

