

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0538

Size: 100T/96S

乙酸激酶（ACK）检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

ACK主要存在于微生物中，催化乙酸和ATP生成乙酰磷酸和ADP，是细菌碳代谢和能量代谢的关键酶，尤其是在古细菌甲烷合成代谢中起着中枢作用。

二、测定原理：

(1) ACK催化乙酸钠和ATP生成乙酰磷酸和ADP，(2) 丙酮酸激酶催化ADP和PEP生成ATP和丙酮酸，(3) 乳酸脱氢酶催化丙酮酸和NADH生成乳酸和NAD⁺，(4) 在340nm下测定NADH氧化生成NAD⁺速率，即可反映ACK活性。

三、需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体×1 支	4℃保存	

五、样本的前处理：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；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1mL提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；15000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。15000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

六、测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

（1）工作液的配置，将试剂二和试剂三转移至试剂一中，充分混合溶解，置于37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）水浴5min；现配现用；

（2）在微量石英比色皿或96孔板中加入20 μL样本和180 μL工作液，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1和3min20s后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

七、ACK 活性计算：

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 536 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/g鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 536 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.072 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02 mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

● 用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1072 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1072 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 2.144 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.02 mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。