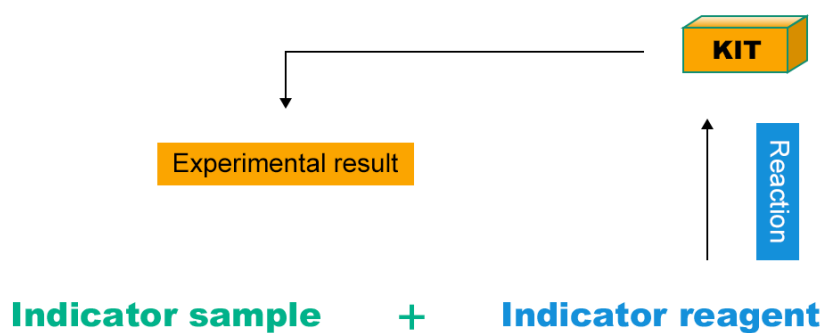


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0807

Size: 50T/48S

乙酸激酶 (ACK) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前每瓶加入 4mL 蒸馏水，充分溶解待用。用不完的试剂仍 4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前每瓶加入 8mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂仍 -20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂仍 -20℃保存
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前每支加入 2mL 蒸馏水，充分溶解待用；现配现用
试剂六	粉剂×1 支	4℃保存	临用前每支加入 1440uL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存
试剂七	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前每支加入 1600uL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存
试剂八	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前每瓶加入 8mL 蒸馏水，充分溶解待用。用不完的试剂仍 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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

六、测定步骤：

试剂	测定管
试剂一（ μL ）	855
试剂二（ μL ）	45
试剂三（ μL ）	150
试剂四（ μL ）	90
试剂五（ μL ）	30
试剂六（ μL ）	30
试剂七（ μL ）	30
试剂八（ μL ）	150
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min	
样本（ μL ）	150

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，加样本的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A_1 和 3 分 20 秒时的吸光度 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意： 若一次性测定样本较多，可将试剂一、二、三、四、五、六、七和八按比例配成混合液，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min 以上，测定时加入 1380 μL 混合液和 150 μL 样本测定。

七、ACK 活性计算：

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 547 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 547 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.094 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 1.53×10^{-3} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；
 d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.15 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：
反应时间，3 min； C_{pr} ：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。