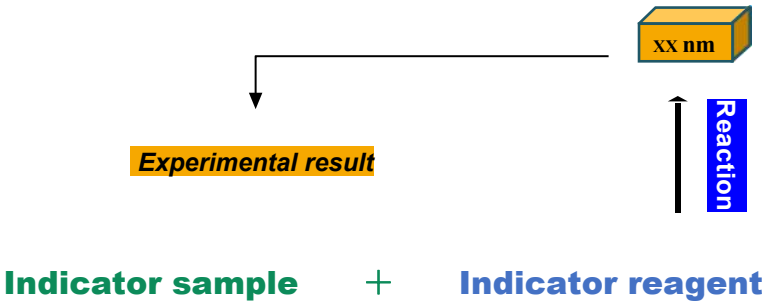
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0538　　规格：100管/96样

乙酸激酶（acetate kinase，ACK）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

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。

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。

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

试剂组成和配制：

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	-

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。

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℃（哺乳动物）或25℃（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20μL样本和180μL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ΔA=A1-A2。

ACK 活性计算：

a.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。

ACK（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr）÷T

=536×ΔA÷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。

ACK（nmol/min/g 鲜重）= [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总）÷T

=536×ΔA÷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。

ACK（nmol/min/10^4cell）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总）÷T

=1.072×ΔA

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。

b.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。

ACK（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr）÷T

=1072×ΔA÷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。

ACK（nmol/min/g 鲜重）= [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总）÷T

=1072×ΔA÷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。

ACK（nmol/min/10^4cell）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总）÷T

=2.144×ΔA

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。