

## 乙酸激酶（ACK）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1438

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

ACK广泛存在于生物体内，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。

测定原理如下：（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<sup>+</sup>，（4）在340nm下测定NADH氧化生成NAD<sup>+</sup>速率，即可反映ACK活性。

**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。**

### 试验中所需的仪器和试剂：

台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1支	2-8℃
试剂三	粉剂×2支	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃
试剂六	液体48μL×1瓶	2-8℃
试剂七	液体48μL×1瓶	-20℃
试剂八	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂九	粉剂×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 提取液：临用前将试剂九加入到提取液中，并于4℃保存；
2. 试剂二：临用前每瓶加入1mL双蒸水，充分溶解待用。用不完的试剂仍4℃保存；
3. 试剂三：临用前每瓶加入1mL双蒸水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃保存；
4. 试剂四：临用前每瓶加入2mL双蒸水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃保存；
5. 试剂五：临用前每支加入0.5mL双蒸水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃保存；
6. 试剂六：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据样本量将试剂六、蒸馏水按43:457（V:V）的比例配制备用，现用现配；
7. 试剂七：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据样本量将试剂七、蒸馏水按1:9（V:V）的比例配制备用，现用现配；
8. 试剂八：临用前加入5mL双蒸水，充分溶解待用。用不完的试剂仍4℃保存；
9. 工作液：吸取0.06mL试剂二、0.2mL试剂三、0.13mL试剂四、0.04mL试剂五、0.04mL试剂六、0.04mL试剂七、0.2mL试剂八混匀，也可根据比例现用现配，于冰上备用。

### 操作步骤（仅供参考）：

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）



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

1. 细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；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 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），15000g，4℃，离心 20 分钟，取上清，置冰上待测。
2. 组织处理：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；15000g，4℃，离心 20 分钟，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）：直接检测。

## 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂一于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）保温 15min。
3. 操作表：

试剂名称	测定管	空白管
蒸馏水（μL）	-	20
试剂一（μL）	110	110
工作液（μL）	70	70
样本（μL）	20	-

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/石英 96 孔板中，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 A1，准确反应 3 分钟立刻 340nm 下比色，记录 3 分 20 秒时的吸光度 A2，计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 1 - A 测定 2， $\Delta A$  空白 = A 空白 1 - A 空白 2，计算  $\Delta A = \Delta A$  测定 -  $\Delta A$  空白。

## 三、ACK 活力计算

### A. 用微量石英比色皿测定：

#### 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。

$$\text{ACK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 536 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### 2. 按样本质量计算：

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。

$$\text{ACK (U/g 质量)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 提取} \times W) \div T = 536 \times \Delta A \div W$$

#### 3. 按细菌或细胞数量计算：

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

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

#### 4. 按血清体积计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）中消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (U/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 536 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.02mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；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； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

### B. 用 96 孔板测定：将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔板光径）进行计算。

#### 注意事项：

1. 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。
2. 反应液的温度必须保持 37℃ 或 25℃，比色皿测定时可取小烧杯一只装入一定量的 37℃ 或 25℃ 蒸馏水，将此烧杯放入 37℃ 或 25℃ 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3.  $\Delta A$  大于 1 时，建议稀释后测量，注意计算公式乘以稀释倍数； $\Delta A$  小于 0.01 时，建议延长反应时间测量，注意计算公式变化。



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