



乙酸激酶活性检测试剂盒

ACK Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK464U

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES464	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK464-A	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK464-B	1 粉剂×2 瓶	-20℃保存;
AK464-C	1.2mL×1 支	4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 乙酸激酶 (acetate kinase, 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理:

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 (10⁴ 个): ES464 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES464), 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): ES464 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES464), 进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 紫外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. 工作液的配置: 临用前取 AK464-B 一瓶, 加入 25mL AK464-A 和 500μL AK464-C, 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;
3. 在 1mL 石英比色皿中加入 100μL 样本和 900μL 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 酶活性计算公式:

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。
$$ACK (nmol/min / mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 536 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$
2. 按样本鲜重计算:
单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。
$$ACK (nmol/min / g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 536 \times \Delta A \div W$$
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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。
$$ACK (nmol/min / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-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 样：加入样本体积，0.1 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；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。