

Acetate kinase Activity Assay Kit

乙酸激酶 (ACK) 试剂盒说明书

货号: G0865F | 方法: 紫外分光法 | 规格: 48 样

一、产品简介:

乙酸激酶 (ACK, EC 2.7.2.1) 是与乙酸代谢相关的关键酶, 催化乙酸和 ATP 生成乙酰磷酸和 ADP, 最终进入三羧酸循环进行乙酸代谢。

ACK 催化乙酸钠和 ATP 生成乙酰磷酸和 ADP, 丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化 NADH 氧化生成 NAD^+ , 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 ACK 活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 8.4mL 的蒸馏水溶解备用, 用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	每支用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、低温台式离心机、恒温培养箱、移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、乙酸激酶 (ACK) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴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); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4 个): 提取液 (mL) 为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂可放在 37℃水浴 5-15min。
- ③ 提取液和试剂一和二和三和四可按照 400:160:40:20:20 比例配成混合液(一枪加 640μL 该混合液) (该混合液用多少配多少，现配现用)：
- ④ 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

试剂名称 (μL)	测定管
提取液	400
试剂一	160
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	20
混匀，37℃下，孵育 5min 后。	
样本	60
混匀，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1， 10min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 187.6 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 187.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

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

$$ACK(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.38 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.06 mL；

V2---反应体系总体积， $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，10 min；

500---细菌或细胞总数，万。

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。