

使用说明书

Instruction Manual

乙酸激酶活性检测试剂盒（微量法）

ACK Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

(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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0012M-ES	100mL×1 瓶	4℃保存
CB0012M-A	30mL×1 瓶	4℃保存
CB0012M-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存
CB0012M-C	500μL×1 支	4℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品

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。

二、样品处理：

- 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）：CB0012M-ES 体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0012M-ES），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。
- 组织：按照组织质量（g）：CB0012M-ES 体积(mL)为 1：5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0012M-ES），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

三、测定步骤：

- 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。
- 工作液的配置：临用前取 CB0012M-B 一瓶，加入 10mL CB0012M-A 和 200μL CB0012M-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；
- 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。

四、ACK 酶活性计算公式：

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

$$\text{ACK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 536 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

注：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，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。

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1072 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.144 \times \Delta A$$

注：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，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。

■ 注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

