

乙酸激酶 (ACK) 活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1437

产品规格: 50管/48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⁺,(4)在340nm下测定NADH氧化生成NAD⁺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、水浴锅、1mL石英比色皿、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50mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×2瓶	-20℃
试剂四	粉剂×2瓶	-20℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃
试剂六	液体96μL×1瓶	2-8℃
试剂七	液体110μL×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4mL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3mL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1mL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0.3mL试剂二、1mL试剂三、0.65mL试剂四、0.2mL试剂五、0.2mL试剂六、0.2mL试剂七、1mL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)

1. 细菌或细胞处理:



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

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）	-	100
试剂一（μL）	545	545
工作液（μL）	355	355
样本（μL）	100	-

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿/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，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中准确反应 3 分钟，迅速取出比色皿并擦干，340nm 下比色，记录 3 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 ΔA 测定=A 测定 1-A 测定 2， ΔA 空白=A 空白 1-A 空白 2，计算 $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白。

三、ACK 活力计算

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；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， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

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. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃ 或 25℃，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. ΔA 大于 1 时，建议稀释后测量，注意计算公式乘以稀释倍数； ΔA 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