

CheKine™ 乙酸激酶 (ACK) 活性检测试剂盒 (微量法)

Cat #: KTB1127

Size: 48 T/48 S 96 T/96 S

	乙酸激酶 (ACK) 活性检测试剂盒 (微量法)		
REF	货号: KTB1127	LOT	批号: 见产品标签
	适用样本: 动植物组织、细胞或细菌、血清 (浆) 或其他液体		
	保质期: -20℃避光保存 6 个月		

原理

乙酸激酶 (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。ACK 催化乙酸钠和 ATP 生成乙酰磷酸和 ADP, 丙酮酸激酶催化 ADP 和 PEP 生成 ATP 和丙酮酸, 乳酸脱氢酶催化丙酮酸和 NADH 生成乳酸和 NAD⁺, 在 340 nm 下测定 NADH 氧化生成 NAD⁺速率, 即可反映 ACK 活性。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent I	15 mL	30 mL	4℃
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×2 vials	-20℃, 避光保存
Reagent III	25 µL	50 µL	4℃, 避光保存

注意: 正式检测前, 建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340 nm 处的吸光度)
- 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
- 恒温水浴锅、制冰机、离心机
- 去离子水
- 匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

Extraction Buffer: 即用型; 使用前, 平衡到室温。4℃保存。

注意: Extraction Buffer 有毒且有刺激性气味, 建议在通风橱进行实验。

Reagent I: 即用型; 使用前, 平衡到室温。4°C保存。

Working Reagent II: 临用前配制; 取 Reagent II 一瓶, 加入 11 mL Reagent I 和 19.8 μL Reagent III, 充分混合溶解, 现配现用。-20°C避光可保存一个月。

Reagent III: 即用型; 使用前, 平衡到室温。4°C避光保存。

样本制备

注意: 推荐使用新鲜样本, 如果不立即进行实验, 样本可在-80°C保存 1 个月。测定时, 应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时, 需在 4 h 内完成样品解冻。

1. 组织: 称取约 0.1 g 样本, 加入 1 mL Extraction Buffer, 冰浴匀浆, 15,000 g, 4°C离心 10 min, 取上清液, 置冰上待测。
2. 细胞或细菌: 收集 500 万细胞或细菌到离心管内, 用冷 PBS 清洗细胞, 离心后弃上清, 加入 1 mL Extraction Buffer, 冰浴超声波破碎细胞或细菌 (功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 然后 15,000 g, 4°C离心 10 min, 取上清液, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 等液体样本: 直接测定。若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定。

注意: 如需测定蛋白浓度, 推荐使用 Abbkine 货号: KTD3001 的蛋白质定量试剂盒 (BCA 法) 进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30 min, 调节波长到 340 nm。紫外分光光度计用去离子水调零。
2. 根据实验用量, 取出部分配制好的 Reagent II 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5 min; 现配现用。
3. 操作表 (下述操作在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中进行):

试剂	测定孔 (μL)
样本	20
Working Reagent II	180

充分混匀, 于 340 nm 处测定 10 s 的吸光值 A_1 与 190 s 的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

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 ΔA 小于 0.05 可适当加大样本量或适当延长反应时间至 10 min 或 20 min 后检测。如果 ΔA 大于 1.0, 样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释, 计算结果乘以稀释倍数, 或减少提取用样本量。

结果计算

注意: 我们为您提供的计算公式, 包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1,072 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 每 g 样品每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 1,072 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

酶活定义: 每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(4) 按液体体积计算:

酶活定义: 每 mL 样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1,072 \times \Delta A$$

ϵ : NADH 微摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 96 孔 UV 板光径, 0.5 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 Extraction Buffer 体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 3 min; 500: 细菌或细胞总数, 5×10^6 。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d: 0.5 cm 调整为 d: 1 cm 进行计算即可。

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°C 或 25°C，比色皿测定时可取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 去离子水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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。

结果展示

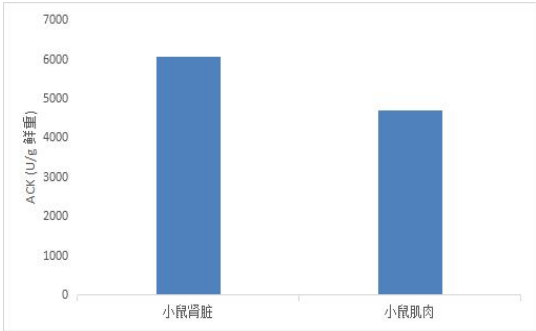


Figure 1. 本试剂盒测定小鼠肾脏和小鼠肌肉中 ACK 的活性

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB1015	CheKine™ α-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

