

乙酸激酶（acetate kinase, ACK）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-QT002 微板法 96 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 120mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 1 瓶 | -20°C保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部，再加 4.2mL 的蒸馏水溶解备用，用不完的试剂分装后-20°C保存。 |
| 试剂二 | 粉剂 4 支 | -20°C保存 | 每支使用前甩几下使试剂落入底部，再加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融，三天内用完。 |
| 试剂三 | 粉剂 2 支 | -20°C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 2 支 | -20°C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：

酶标仪、96 孔板、低温台式离心机、恒温培养箱、可调式移液器、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°C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°C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（10⁴ 个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂可放在 37°C水浴 5-15min。

③ 提取液和试剂一和二和三和四可按照 100:40:20:10:10 比例配成混合液（一枪加 180μL

该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|--|-----|
| 提取液 | 100 |
| 试剂一 | 40 |
| 试剂二 | 20 |
| 试剂三 | 10 |
| 试剂四 | 10 |
| 混匀, 37°C下, 孵育 5min 后。 | |
| 样本 | 20 |
| 混匀, 37°C下, 10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 10min 后读取吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。 | |

- 【注】1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 20min 或更长读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量 V1 (如增至 40μL, 则提取液相应减少), 则改变后的加样体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1, 则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测;
3. 若 A2 值在 0.25 附近或 ΔA 大于 0.6, 可减少反应时间 (如 5min), 则改变后的反应时间 T 代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

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。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

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。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。