

乙酸激酶（acetate kinase, ACK）试剂盒说明书

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 mg×1 瓶	4°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。
试剂二	粉剂 mg×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 mg×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 2.1mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 2.1mL 的蒸馏水溶解备用。

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 所有试剂解冻至室温（25°C）。

③ 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称（ μL ）	测定管
提取液	80
试剂一	40
试剂二	20

试剂三	20
试剂四	20
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 40 μ L，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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； 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，500 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。