



## 乙酸激酶活性检测试剂盒

### ACK Assay Kit

微量法

产品编号：AK464M

产品规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES464	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK464-A	30mL×1 瓶	4℃保存；
AK464-B	1 粉剂×2 瓶	-20℃保存；
AK464-C	500μL×1 支	4℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

#### 简介：

**意义：**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。

**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<sup>+</sup>，(4) 在 340nm 下测定 NADH 氧化生成 NAD<sup>+</sup>速率，即可反映 ACK 活性。

#### 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。

#### 样品处理：

1. 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 (10<sup>4</sup> 个) : ES464 体积 (mL) 为 500~1000 : 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES464)，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。
2. 组织：按照组织质量 (g) : ES464 体积 (mL) 为 1 : 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES464)，进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 测定步骤：

1. 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。
2. 工作液的配置：临用前取 AK464-B 一瓶，加入 10mL AK464-A 和 200μL AK464-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；
3. 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。

#### 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。

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

(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。

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

**注：** V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

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

(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。

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

(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。

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

**注：** V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。