

## 乙酸激酶 (acetate kinase, ACK) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

(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。

### 试剂组成和配制：

产品名称	OT002-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	30ml	4°C
试剂二：粉剂	2 瓶	-20°C
试剂三：液体	500μl	4°C
说明书	一份	

### 需自备的仪器和用品：

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

### 样本的前处理：

#### 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）：提取液体积（ml）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液），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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（ml）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 提取液），进行冰浴匀浆。15000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 测定步骤：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

1、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、样本测定

(1) 工作液的配置：临用前取试剂二一瓶，加入 10ml 试剂一和 200 $\mu$ l 试剂三，充分混合溶解，置于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）水浴 5min；现配现用；

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20 $\mu$ l 样本和 180 $\mu$ l 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 3min20s。

### ACK 活性计算：

#### 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。

$$\text{ACK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 536 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 536 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ACK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1072 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ACK (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.144 \times \Delta A$$

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。

