

乙酸激酶（acetate kinase, ACK）试剂盒说明书

（货号：BP10410F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 8.4mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 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： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.6mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 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	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 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	液体 2 支	-20°C保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 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℃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（ 10^4 个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂可放在 37℃水浴 5-15min。
- ③ 提取液和试剂一和二和三和四可按照 400:160:40:20:20 比例配成混合液（一枪加 640μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）：
- ④ 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

试剂组分（μL）	测定管
提取液	400
试剂一	160
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	20
混匀，37℃下，孵育 5min 后。	
样本	60
混匀，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 100μL，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℃离心 10min，上清液用于检测；
3. 若 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。

$$ACK(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 187.6 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$ACK(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 187.6 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升组织蛋白每小时消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 187.6 \times \Delta A$$

4、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。

$$ACK(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.38 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d ---光径, 1cm;
 V ---加入提取液体积, 1 mL; $V1$ ---加入样本体积, 0.06 mL;
 $V2$ ---反应体系总体积, $7 \times 10^{-4} \text{ L}$; 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。