

乙酸激酶（ACK）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC3170

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂一	液体 33 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂六	液体 120 μL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 135 μL×1 支	2-8℃保存
试剂八	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

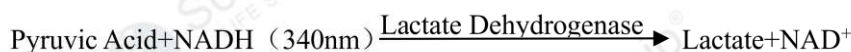
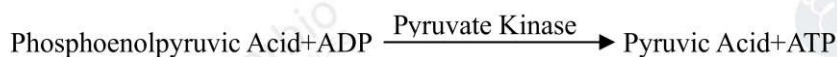
- 1、提取液：临用前将粉剂一加入到提取液中，2-8℃可保存 4 周，禁放-20℃或者冰箱贴壁低温位置；
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 6mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周；
- 3、试剂四：临用前每瓶加入 4mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周；
- 4、试剂五：临用前每支加入 1.2mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周；
- 5、试剂六工作液：临用前根据样本量按照试剂六：蒸馏水=18μL：191μL（209μL，约 10T）的比例配制，现用现配；
- 6、试剂七工作液：临用前根据样本量按照试剂七：蒸馏水=20μL：180μL（200μL，约 10T）的比例配制，现用现配；
- 7、工作液的配制：临用前根据样本量按照试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六工作液：试剂七工作液：试剂八=0.3mL：1mL：0.65mL：0.2mL：0.2mL：0.2mL：1mL（3.55mL，约 10T）的比例配制，现用现配，于冰上备用。

产品说明：

乙酸激酶（Acetate Kinase, ACK, EC 2.7.2.1）广泛存在于生物体内，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。

ACK能够催化乙酸钠和ATP生成乙酰磷酸和ADP，丙酮酸激酶催化ADP和磷酸烯醇式丙酮酸生成ATP和丙酮酸，乳酸脱氢酶进一步催化丙酮酸和NADH生成乳酸和NAD⁺，引起340nm处吸光度下降。通过测定NADH的变化，计算ACK活性的高低。





注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、恒温水浴锅、1mL 石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌或细胞处理：

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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）=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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），15000g 4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、组织处理：

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℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）：直接检测。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、将试剂一于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）保温15min。

3、操作表：

试剂名称	测定管	空白管
试剂一（μL）	550	550
工作液（μL）	350	350
样本（μL）	100	-
蒸馏水（μL）	-	100

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，加样本的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将 1mL 石英比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中准确反应 3 分钟；迅速取出 1mL 石英比色皿并擦干，340nm 下比色，记录 3 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，测定， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ，计算 $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。空白管只需做 1-2 次。

三、ACK活性计算

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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

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

2. 按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACK (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T \times F = 536 \times \Delta A \div W \times F$$



3. 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$ACK(U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T \times F = 536 \times \Delta A \div N \times F$$

4. 按血清体积计算:

单位的定义: 每mL血清(浆)中消耗1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$ACK(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \times F = 536 \times \Delta A \times F$$

V反总: 反应体系总体积, 0.001L; ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 1 mL石英比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.1mL; V提取: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 3min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以 10^4 计; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$; F: 稀释倍数。

注意事项:

- 1、测定过程中样本和所有试剂在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、1mL石英比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C , 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把1mL石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 3、 ΔA 大于1时, 建议稀释后测量, 注意计算公式乘以稀释倍数; ΔA 小于0.01时, 建议延长反应时间测量, 注意计算公式变化。

相关发表文献:

[1] Qiu S, Xia W, Xu J, Li Z, Ge S. Impacts of 2-bromoethanesulfonic sodium on methanogenesis: Methanogen metabolism and community structure. Water Res. 2023 Feb 15;230:119527. doi: 10.1016/j.watres.2022.119527. Epub 2022 Dec 23. PMID: 36580800.

[2] Qiu S, Zhang X, Xia W, Li Z, Wang L, Chen Z, Ge S. Effect of extreme pH conditions on methanogenesis: Methanogen metabolism and community structure. Sci Total Environ. 2023 Jun 15;877:162702. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162702. Epub 2023 Mar 9. PMID: 36898547.

参考文献:

[1] Mukhopadhyay S, Hasson M S, Sanders D A. A continuous assay of acetate kinase activity: Measurement of inorganic phosphate release generated by hydroxylaminolysis of acetyl phosphate[J]. Bioorganic chemistry, 2008, 36(2): 65-69.

相关系列产品:

- BC2030/BC2035 异柠檬酸裂解酶(ICL)活性检测试剂盒
- BC3120/BC3125 植物脱氢酶(PDHA)活性检测试剂盒
- BC2010/BC2015 乙醇酸氧化酶(GO)活性检测试剂盒

