

乙酸激酶（ACK）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC3175

规格：100T/96S

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.7 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 40 μL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 45 μL×1 支	2-8℃保存
试剂八	液体 2.5 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

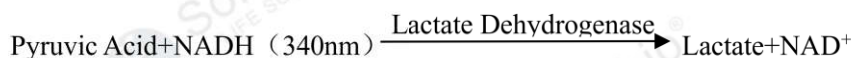
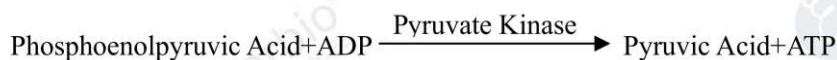
- 1、提取液：临用前将粉剂一加入到提取液中，2-8℃可保存 4 周，禁放-20℃或者冰箱贴壁低温位置；
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 2.2mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周；
- 3、试剂四：临用前加入 1.5mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周；
- 4、试剂五：临用前加入 0.5mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周；
- 5、试剂六工作液：临用前根据样本量按照试剂六：蒸馏水=3.5μL：37μL（40.5μL，约 10T）的比例配制，现用现配；
- 6、试剂七工作液：临用前根据样本量按照试剂七：蒸馏水=4μL：36μL（40μL，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=60μL：200μL：130μL：40μL：40μL：200μL（710μL，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/酶标仪、台式离心机、恒温水浴锅、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。

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）	110	110
工作液（μL）	70	70
样本（μL）	20	-
蒸馏水（μL）	-	20

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96 孔 UV 板中，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，准确反应 3 分钟立刻 340nm 下比色，记录 3 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白，计算 $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。空白管只需做 1-2 次。

三、ACK 活性计算

A. 用微量石英比色皿测定：

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。

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

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， $2 \times 10^{-4}L$ ； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 L/mol/cm$ ；d：微量石英比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02mL；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， $1mol=10^9nmol$ ；F：稀释倍数。

B.用96孔UV板测定：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔UV板光径）进行计算。

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、反应液的温度必须保持37°C或25°C，微量石英比色皿测定时可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。在反应过程中把微量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.
- [3] Liu Y, Zhang Z, Jiang W, Gu Y. Protein acetylation-mediated cross regulation of acetic acid and ethanol synthesis in the gas-fermenting Clostridium ljungdahlii. J Biol Chem. 2022 Feb;298(2):101538. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101538. Epub 2021 Dec 24. PMID: 34954142; PMCID: PMC8814400.

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

