

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

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

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体30mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2瓶，-20℃保存；

试剂三：液体500μL×1支，4℃保存；

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（10⁴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℃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℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

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200μL试剂三，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；

(2) 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。

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。

$$ACK (\text{nmol/min /g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 536 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$ACK (\text{nmol/min /104 cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。

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

(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。

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

(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。

$$ACK (\text{nmol/min /104 cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.144 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。