乙酸激酶（acetate kinase，ACK）试剂盒说明书

（货号：G0865F 分光法 48 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 8.4mL 的蒸馏水溶解备用，用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	每支用前甩几下使试剂落入底部，再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，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	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，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、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、低温台式离心机、恒温培养箱、移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、乙酸激酶（ACK）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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℃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 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、上机检测：

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 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：

试剂名称（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，ΔA=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(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(Cpr×V1÷V)÷T =187.6×ΔA÷Cpr

2、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(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=187.6×ΔA÷W

3、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(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.38×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /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，7×10^{-4} 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。