

## 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 催化乙酸钠和 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<sup>+</sup>, (4) 在 340nm 下测定 NADH 氧化生成 NAD<sup>+</sup>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 500 μL×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 (10<sup>4</sup> 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 200 μL 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 20 μL 样本和 180 μL 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  $\Delta A = A1 - A2$ 。

### 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。

$ACK \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 536 \times \Delta A \div C_{pr}$

(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。  
 $ACK (nmol/min / 10^4 cell) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 1.072 \times \Delta A$   
V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

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

(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。

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

(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。

$ACK (nmol/min / 10^4 cell) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 2.144 \times \Delta A$

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