



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

乙酸激酶活性检测试剂盒(微量法)

货号: R42103

规格: 100T/96S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES464	100mL×1瓶	4℃保存;
试剂-A	30mL×1瓶	4℃保存;
试剂-B	1粉剂×2瓶	-20℃保存;
试剂-C	500μL×1支	4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 乙酸激酶 (acetate kinase, 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。

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

自备用品:

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。

样品处理:

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): ES464 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌



或细胞加入 1mL ES464)，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）：ES464 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入1mL ES464），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤:

1. 紫外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. 工作液的配置：临用前取 试剂-B 一瓶，加入 10mL 试剂-A 和 200μL 试剂-C，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；
3. 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

ACK 酶活性计算公式:

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。

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

（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。

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

（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。

$$\text{ACK (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$



注: 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。

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

(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。

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

(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。

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

注: 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。