CheKine™ 乙酸激酶（ACK）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1127　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细胞或细菌、血清（浆）或其他液体
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

乙酸激酶（Acetate Kinase，ACK）（EC 2.7.2.1）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。

本试剂盒检测原理是 ACK 催化乙酸钠和 ATP 生成乙酰磷酸和 ADP，丙酮酸激酶催化 ADP 和 PEP 生成 ATP 和丙酮酸，乳酸脱氢酶催化丙酮酸和 NADH 生成乳酸和 NAD^+，在 340 nm 下测定 NADH 氧化生成 NAD^+的速率，即可反映 ACK 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent Ⅰ	15 mL	30 mL	4℃
Reagent Ⅱ	Powder×1 vial	Powder×2 vials	-20℃，避光保存
Reagent Ⅲ	25 μL	50 μL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS	样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、超声破碎仪（细胞或细菌）、恒温水浴锅、制冰机、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存；**Extraction Buffer 有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验**
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent Ⅱ	临用前配制；取 Reagent Ⅱ一瓶，加入 11 mL Reagent Ⅰ和 19.8 μL Reagent Ⅲ，充分混合溶解	未用完的试剂-20℃避光可保存一个月
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞（菌）或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，15000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Extraction Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，

重复 30 次），4℃，15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

- **血清（浆）等液体样本**：直接测定。若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定。

05-3 实验步骤

注意：测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变形和失活。

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。

2. 根据实验用量，取出部分配制好的 Working Reagent Ⅱ置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5 min。

3. 检测体系配制：在 96 孔 UV 板中按照如下方式操作

试剂	测定孔（μL）
样本	20
Working Reagent Ⅱ	180

4. 吸光度检测：充分混匀测定 340 nm 处吸光值。记录第 10 s 和 190 s 时吸光值，分别记录为 A_1 和 A_2。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] **>** 进入“**技术中心**”**>** 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_1-A_2$。

2. 样本 ACK 活性计算

- 按样本质量计算

酶活定义：每 g 样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACK (U/g)=[ΔA×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样}$×W÷$V_{样总}$)÷T**=1072×ΔA÷W**

- 按细胞或细菌数量计算:

酶活定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACK ($U/10^4$)=[ΔA×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(N×$V_{样}$÷$V_{样总}$)÷T**=1072×ΔA÷N**

- 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACK (U/mL)=[ΔA×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷$V_{样}$÷T**=1072×ΔA**

- 按蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACK (U/mg prot)=[ΔA×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样}$×Cpr)÷T**=1072×ΔA÷Cpr**

ε：NADH 微摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} L；$V_{样}$：反应体系中样本体积，0.02 mL；$V_{样总}$：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，3 min；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1: 取 0.101 g 小鼠脾脏, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板进行检测。测得$\Delta A=A_1-A_2=1.172-0.595=0.577$。按样本质量计算得：ACK (U/g)=1072×ΔA÷W=6124.198 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

如果ΔA 小于 0.05 可适当加大样本量或适当延长反应时间至 10 min 或 20 min 后检测。如果ΔA 大于 1.0，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

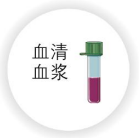
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1015	CheKine™ α-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

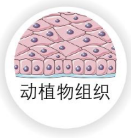
CheKine™ 乙酸激酶（ACK）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1127）

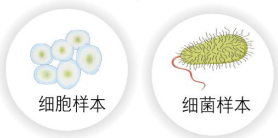
样本处理



根据实际需求对样本
稀释或不稀释



1 mL Extraction Buffer
冰浴匀浆



收集清洗的细胞或细菌
1 mL Extraction Buffer
冰浴超声破碎5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次）



15000 g，4℃离心10 min，取上清



体系配置

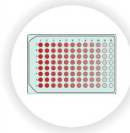
根据实验用量，取出部分配制好的Working Reagent II
置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5 min



样本	20 µL
Working Reagent II	180 µL

充分混匀

数据检测



测定10 s和190 s时340 nm吸光度
结果计算

V1.0