



## 肌酸激酶(CK)活性检测试剂盒(微量法)

中文名称：**肌酸激酶(CK)活性检测试剂盒(微量法)**

英文名称：Creatine Kinase(CK) Activity Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

推 荐：若使用 96 孔板测定，需使用 96 孔 UV 板

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存

### 溶液的配制：

- 1、 试剂一：临用前加 5 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 2、 试剂二：临用前加入 0.5 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 3、 试剂三：临用前加入 0.5 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 4、 试剂四：临用前加入 0.65 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；



融; 5、工作液: 临用前根据用量将试剂一、试剂二、试剂三、试剂四、试剂五以 70:4:7:10:90 的比例混合(体积比)。现用现配。使用前室温孵育 20min(该步骤不可省略)。

#### 产品说明:

肌酸激酶(Creatine Kinase, CK) (EC 2.7.3.2)也成为肌酸磷酸激酶, 主要存在于心脏、肌肉以及脑等组织中, 能可逆地催化肌酸与 ATP 之间的转磷酸基反应, 是一个与细胞能量运转、肌肉收缩、ATP 再生有直接关系的重要激酶。CK 催化磷酸肌酸和 ADP 生成肌酸和 ATP, 己糖激酶催化 ATP 与葡萄糖形成 6-磷酸葡萄糖, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖与 NADP<sup>+</sup>生成 NADPH, 导致 340nm 光吸收值增加, 以此来表示 CK 酶活。

**注意:** 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

#### 需自备的仪器和用品:

天平、低温离心机、恒温水浴锅、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、恒温水浴锅、研钵/匀浆器、蒸馏水。

#### 操作步骤:

##### 一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1. 组织样本: 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, 然后 10000g, 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。
2. 血清样本: 直接测定。
3. 细胞样本: 按照细胞数量(10<sup>4</sup> 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细胞加入 1mL 提取液)加入提取液, 冰浴超声波破碎细胞(功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清待测。



## 二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，用蒸馏水调零。

2、操作表：在微量石英比色皿/96 孔板中加入下列试剂

	空白管	测定管
样本(μL)		40
工作液(μL)	90	90
H2O(μL)	110	70

在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入上述试剂,充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37°C 水浴或者培养箱 3min(有控温功能的酶标仪可以设置独特为 37°C), 拿出迅速擦干测定 190s 时的吸光值 A2, 计算  $\Delta A$  测定管 = A2 测定 - A1 测定,  $\Delta A$  空白管 = A2 空白 - A1 空白,  $\Delta A = \Delta A$  测定管 -  $\Delta A$  空白管。(空白管只需做 1-2 次)

## 三、CK 活性计算

### 1、按微量石英比色皿计算

(1) 按组织蛋白浓度计算:酶活定义:37°C, pH7.0 时,每毫克蛋白质每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。CK 活性(U/mg prot)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(2) 按组织样本质量计算:酶活定义:37°C, pH7.0 时,每克样本每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。CK 活性(U/g 质量)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 268 \times \Delta A \div W$

(3) 按血清体积计算:酶活定义:37°C, pH7.0 时,每 mL 血清每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。CK 活性(U/mL)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 268 \times \Delta A$

(4) 按细胞数量计算:酶活定义:37°C, pH7.0 时,每 1 万个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。CK 活性(U/10<sup>4</sup> cell)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$   
 $\epsilon$ : NADPH 的摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup>L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总:反应体系总体积, 2×10<sup>-4</sup>L; V 样:反应体系中样本体积, 0.04mL;



V 样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 细胞数量:

以  $10^4$  为单位计算, 万个; T: 反应时间, 3min;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

2、按 96 孔 UV 板计算将上述公式中的  $d=1\text{cm}$  改为  $0.6\text{cm}$ (96 孔板光径)进行计算即可。

#### 注意事项:

1. 血清的 CK 不稳定, 采集样本后尽快测定,  $4^\circ\text{C}$  避光保存可稳定 24h。
2. 样本蛋白质含量需要另外测定。
3. OD 值大于 0.6 可用提取液适当稀释样本, 并在计算公式中相应的改变稀释倍数。
4.  $\Delta A$  空白管一般不超过 0.01。

#### 实验实例:

1、取 0.1g 小鼠脑加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后再用提取液稀释 8 倍, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定管 =  $A_2$  测定 -  $A_1$  测定 =  $0.4175 - 0.1314 = 0.2861$ ,  $\Delta A$  空白管 =  $A_2$  空白 -  $A_1$  空白 =  $0.1304 - 0.1256 = 0.0048$ ,  $\Delta A = \Delta A$  测定管 -  $\Delta A$  空白管 =  $0.2861 - 0.0048 = 0.2813$ , 按组织样本质量计算得:

CK 活性 (U/g 质量) =  $268 \times \Delta A \div W \times 8$  (稀释倍数) =  $268 \times 0.2813 \div 0.1 \times 8$  (稀释倍数) =  $6031.072$  U/g 质量。

2、取兔血清直接检测, 用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定管 =  $A_2$  测定 -  $A_1$  测定 =  $0.5761 - 0.4649 = 0.1112$ ,  $\Delta A$  空白管 =  $A_2$  空白 -  $A_1$  空白 =  $0.1304 - 0.1256 = 0.0048$ ,  $\Delta A = \Delta A$  测定管 -  $\Delta A$  空白管 =  $0.1112 - 0.0048 = 0.1064$ , 按血清体积计算得:

CK 活性 (U/mL) =  $268 \times \Delta A = 268 \times 0.1064 = 28.5152$  U/mL。