



肌酸激酶活性检测试剂盒 Creatine Kinase(CK) Activity Assay Kit

微量法

产品编号: AK532M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES532	110 mL×1 瓶	4℃保存
AK532-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 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;
AK532-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 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;
AK532-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 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;
AK532-D	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 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;
AK532-E	5 mL×1 瓶	4℃保存;
工作液: 临用前根据用量将试剂 A、试剂 B、试剂 C、试剂 D、试剂 E 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		

※ 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: 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。

原理: 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⁺生成 NADPH, 导致 340nm 光吸收值增加, 以此来表示 CK 酶活。

自备用品:

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。

粗酶液提取:

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℃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(10⁴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℃, 10000g 离心 10min, 取上清待测。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 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 (μL)	测定管 (μL)
粗酶液		40
工作液	90	90
H ₂ O	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℃水浴或者培养箱 3min，拿出迅速擦干测定 190s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定管= A2 测定-A1 测定，ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管。（空白管只需做 1-2 次）		

CK 活性计算公式：

a. 按微量石英比色皿计算

1. 按蛋白浓度计算：

活性单位定义：37℃，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。

$$\text{CK 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算：

活性单位定义：37℃，pH7.0 时，每克样本每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 268 \times \Delta A \div W$$

3. 按血清体积计算

活性单位定义：37℃，pH7.0 时，每 mL 血清每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 268 \times \Delta A$$

4. 按细胞数量计算：

活性单位定义：37℃，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。

$$\text{CK 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

ε：NADPH 的摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V_{反总}：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；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 10⁴ 为单位计算，万个；T：反应时间，3min；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

b. 按 96 孔 UV 板计算

将上述公式中的 d=1cm 改为 0.6cm（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℃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。