

使用说明书

Instruction Manual

肌酸激酶活性检测试剂盒（微量法）

Creatine Kinase(CK) Activity Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0056M-ES	110mL×1 瓶	4℃保存。
CB0056M-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前加 5mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
CB0056M-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前加入 0.5mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
CB0056M-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前加入 0.5mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
CB0056M-D	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前加入 0.65mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
CB0056M-E	5mL×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。		

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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。

二、粗酶液提取：

- 组织样本：按照组织质量(g):CB0056M-ES 体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织,加入 1mLCB0056M-ES)进行冰浴匀浆，然后 10000g, 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。
- 血清样本：直接测定。
- 细胞样本：按照细胞数量 (10⁴ 个): CB0056M-ES 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL CB0056M-ES）加入 CB0056M-ES，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。

三、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：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
粗酶液		40
工作液	90	90
H2O	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， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管。（空白管只需做 1-2 次）

四、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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

注： ϵ ：NADPH 的摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，1cm； V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； V 样：反应体系中样本体积，0.04mL； V 样总：CB0056M-ES 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， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

b. 按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 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 CB0056M-ES 适当稀释样本，并在计算公式中相应的改变稀释倍数。
4. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

