

肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 测定试剂盒说明书

(货号:G0855W96 微板法 96 样)

一、产品简介:

肌酸激酶 (CK, EC 2.7.3.2) 主要存在于心脏、肌肉及脑等组织中, 能可逆地催化肌酸与 ATP 之间的转磷酸基反应, 在能量运转、肌肉收缩和 ATP 再生中有重要作用。

CK 催化磷酸肌酸和 ADP 生成肌酸和 ATP, 通过添加的己糖激酶与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶复合体, 依次催化 ATP 的水解与并伴随着 NADPH 的生成, 通过检测 NADPH 在 340nm 处吸光值的增加即可得出 CK 酶活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂二	粉剂×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂×4 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 每支加 0.3mL 蒸馏水充分溶解。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板天平、低温离心机、可调式移液器、恒温培养箱、研钵。

四、肌酸激酶 (CK) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 转移至 EP 管中, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 设定温度至 37℃, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂可预先在 37℃ 条件下预温 5min, 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150

37°C条件下孵育 20min,	
试剂四	10
混匀, 37°C条件下, 立即于 340nm 处读取 A1, 15min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1.若 A 测定大于 1.5, 则可减少反应时间 T (如减至 10min) 再读取 A2, 或减少样本加样量 V1 (如减至 5 μ L, 则试剂三相应增加), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 ΔA 的值小于 0.01, 则可增大样本体积 V1 (如增至 80 μ L 或更多, 则试剂三相应减少), 或延长反应时间 T (如增至 30min 或更长), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按组织蛋白含量计算:

定义: 37°C条件下, 每毫克蛋白质在每分钟内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 214.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按组织样本质量计算:

定义: 37°C条件下, 每克样品在每分钟内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \div V \times W) \div T = 214.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

定义: 37°C条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V)] \div T = 0.43 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

定义: 37°C条件下, 每毫升液体在每分钟内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 214.4 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 15min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。