



## 肌酸激酶(CK)活性检测试剂盒(紫外分光光度法)

中文名称：**肌酸激酶(CK)活性检测试剂盒(紫外分光光度法)**

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：紫外分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 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×2 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加 10 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：临用前取 1 支加入 0.5mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 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；



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、1mL 石英比色皿、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℃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( $10^4$ 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 用蒸馏水调零。

2、操作表: 在 1mL 比色皿中加入下列试剂

	空白管	测定管
样本(μL)		200
工作液(μL)	450	450
H2O(μL)	550	350

在 1mL 石英比色皿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 3min, 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。

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

### 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。

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

### 3. 按血清体积计算:

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。

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

### 4. 按细胞数量计算:

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)=  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 268 \times \Delta A \div$   
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, 0.001L; V 样: 反应体系中样本体积, 0.2mL; 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<sup>4</sup>为单位, 万个; T: 反应时间, 3min; 10<sup>9</sup>: 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol。

#### 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。
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 4 倍, 之后按照测定步骤操作, 用 1mL 石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定管=A2 测定-A1 测定=0.638-0.149=0.489,  $\Delta A$  空白管=A2 空白-A1 空白=0,  $\Delta A = \Delta A$

测定管- $\Delta A$  空白管=0.489-0=0.489, 按组织样本质量计算酶活得:

CK 活性(U/g 质量) =  $268 \times \Delta A \div W \times 4$ (稀释倍数) =  $268 \times 0.489 \div 0.1 \times 4$ (稀释倍数)  
=5242.08 U/g 质量。

2、取鸭血清 200 $\mu$ L, 按照测定步骤操作, 测得计算  $\Delta A$  测定管=A2 测定-A1 测定=0.445-0.423=0.022,  $\Delta A$  空白管=A2

空白-A1 空白=0,  $\Delta A = \Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管=0.022-0=0.022, 按血清体积计算酶活得:



CK 活性(U/mL)=268×ΔA=268×0.022=5.896 U/mL。