

## 肌酸激酶活性试剂盒 96 样

规格：微量法 96 样

检测原理：NADPH 速率法

编号：ml300889

检测波长：340nm

**注 意：**正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

肌酸激酶（CK）主要存在于心脏、肌肉以及脑等组织中，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 再生等有直接关系的重要激酶。

### 测定原理：

肌酸激酶能够催化磷酸肌酸和 ADP 生成肌酸和 ATP，己糖激酶（Hexokinase）催化 ATP 和葡萄糖合成 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步催化 6-磷酸葡萄糖脱氢生成 NADPH，NADPH 在 340 nm 有特征吸收峰，通过测定 340 nm 处吸光值变化即可表征肌酸激酶的活性。

### 需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96UV 孔板、研钵、水浴锅和蒸馏水。

### 试剂的组成：

提取液：液体 120mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 24mL×1 瓶，4℃避光保存（可保存 3 个月）；

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃避光保存（可保存 3 个月）。

### 样本处理：

**细菌或培养细胞：**先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液）匀浆处理，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**组织：**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 0.9mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**血清（浆）样品：**直接测定。

### 测定步骤:

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节温度至 37°C, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂二 37°C 预热 10min。
- 3、在 96 孔 UV 板中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂一	200
混匀, 37°C 孵育 5min	
试剂二 (已预热 10min)	20
混匀, 记录 37°C, 340nm 下 10s 时的吸光值 A1 和 5min10s 时的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$	

**注意:** 如果  $\Delta A$  小于 0.05, 可延长反应时间或增加样本量。如果  $\Delta A$  大于 0.8, 可将样本待测液用提取液稀释后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数。

### CK 活性计算:

#### 1、血清 (浆) CK 活性

37°C 条件下, 每升血清 (浆) 每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1μmol 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{CK 活性 (U/L)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

#### 2、组织、细菌或细胞 CK 活性

##### (1) 按样本鲜重计算

单位定义: 37°C 条件下, 每克组织每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1μmol 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{CK 活性 (U/g)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{组提}} \div W \div T$$

##### (2) 按细菌或细胞数量计算

单位定义: 37°C 条件下, 每  $10^4$  个细胞或细菌每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1μmol 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

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

$\epsilon$ : NADPH 在 340nm 处的微摩尔吸光系数,  $6.22 \times 10^{-3} \text{L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{cm})$

d: 96 孔酶标板的光径, 0.6cm

$V_{\text{总}}$ : 反应总体积, 0.23mL;

$V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积, 0.01mL;

T: 反应时间, 5min;

V 组提：组织样本加入提取液体积，0.0009L；

V 细提：细胞或细菌样本加入提取液体积，0.001L；

细胞数量：以万计；

W:样本重量，g。

#### 预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。