

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K558-M

产品规格: 48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器: 酶标仪 (320 - 360 nm)

## Elabscience®肌酸激酶(CK)比色法测试盒

### Creatine Kinase (CK) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞样本中肌酸激酶(CK)活力。

## 检测原理

磷酸肌酸激酶(CK, EC 2.7.3.2)催化磷酸肌酸和ADP生成肌酸和ATP, 己糖激酶(HK, Hexokinase)催化肌酸与葡萄糖形成6-磷酸葡萄糖, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6P-DH, Glucose-6-phosphate dehydrogenase)催化6-磷酸葡萄糖与NADP<sup>+</sup>生成NADPH, 引起340 nm波长处吸光值增加。

本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司BCA试剂盒进行测定(货号E-BC-K318-M)。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	酶溶液 (Enzyme Solution)	14 mL×1 瓶	28 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存3个月
试剂二 (Reagent 2)	酸溶液 (Acid Solution)	4 mL×1 瓶	8 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存3个月
	96孔紫外酶标板	1板		
	96孔覆膜	2张		
	样本位置标记表	1张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪（波长 320-360 nm，最佳检测波长为 340 nm）、涡旋混匀仪、37℃ 恒温箱、微量移液器（200 μL，50 μL，10 μL）

**试剂：**双蒸水、PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）

## 试剂准备

检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温，试剂二 37℃ 恒温箱中温育 10 min。

## 样本准备

### ① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：称取 0.02 g 组织样本，加入 0.18 mL PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 匀浆，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清液进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取  $1 \times 10^6$  个细胞加入 200 μL PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 匀浆处理，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清液进行蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：13.55-115.86 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	$1 \times 10^6$ 个 HepG2 细胞	不稀释
人血浆	不稀释	10% 大鼠肾组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	10% 大鼠脑组织	2-5
大鼠血清	不稀释	10% 大鼠肝组织	2-10

注：样本稀释液为 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)。

## 实验关键点

- ① 血清、血浆样本须澄清。
- ② 待测样本需要放置在冰盒上操作。
- ③ 建议试剂一分装取用，避免污染。

## 操作步骤

- ① 空白孔：取 10  $\mu\text{L}$  双蒸水，加入相应的酶标孔中。  
测定孔：取 10  $\mu\text{L}$  待测样本，加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔，加入 200  $\mu\text{L}$  的试剂一。
- ③ 充分混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min。
- ④ 向步骤③中各孔，加入 20  $\mu\text{L}$  已经温育 10 min 的试剂二。
- ⑤ 充分混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min，酶标仪于 340 nm 处，测定 OD 值为  $A_1$ 。
- ⑥ 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min 后，测定 OD 值为  $A_2$ ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

## 操作表

	空白孔	测定孔
双蒸水 ( $\mu\text{L}$ )	10	--
待测样本 ( $\mu\text{L}$ )		10
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	200	200
充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min		
试剂二 (已温育 10 min) ( $\mu\text{L}$ )	20	20
充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min，酶标仪于 340 nm 处，测定 OD 值为 $A_1$ ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min，测定 OD 值为 $A_2$ ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 结果计算

### 血清（浆）中 CK 活力计算：

定义：37℃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 1 μmol 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{CK 活力 (U/L)} = \frac{\Delta A}{t \times 0.6 \times \varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \times f$$

### 组织或细胞中 CK 活力计算：

定义：37℃条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1 μmol 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{CK 活力 (U/gprot)} = \frac{\Delta A}{t \times 0.6 \times \varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \div C_{\text{pr}} \times f$$

### 注解：

$\Delta A$ ： $\Delta A = A_2 - A_1$

t：样本在 37℃下反应的时间，5 min

0.6：酶标板孔的光径，0.6 cm

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

$V_{\text{总}}$ ：反应液的总体积，0.23 mL

$V_{\text{样}}$ ：样本体积，0.01 mL

f：样本检测前稀释的倍数

$C_{\text{pr}}$ ：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

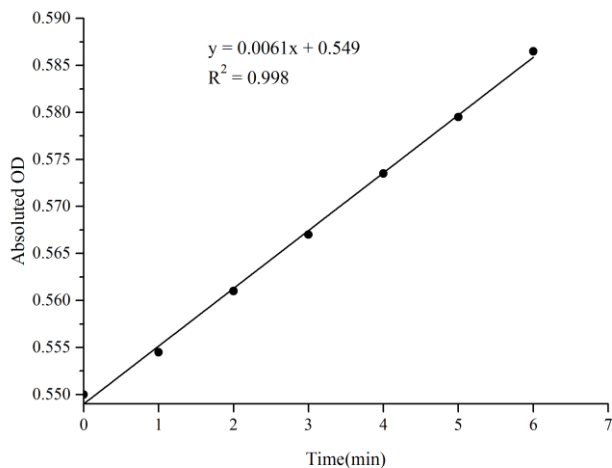
检测范围	13.55-115.86 U/L	批间差	3.4-9.6 %
灵敏度	6.16 U/L	批内差	2.5-7.4 %
稀释回收率	100-105 %		

### 2. 样本反应曲线(数据仅供参考)

①以大鼠肝组织为例，取10%大鼠肝组织匀浆10 μL，按照操作表进行操作，记录测定OD值A<sub>1</sub>后，测六分钟的动力学，每分钟测定一次测定管，记录OD值，结果如下：

时间(min)	0	1	2	3	4	5	6
测定管 OD 值	0.550	0.554	0.561	0.567	0.573	0.579	0.586

②绘制反应曲线，如下图所示：



## 附录2 实例分析

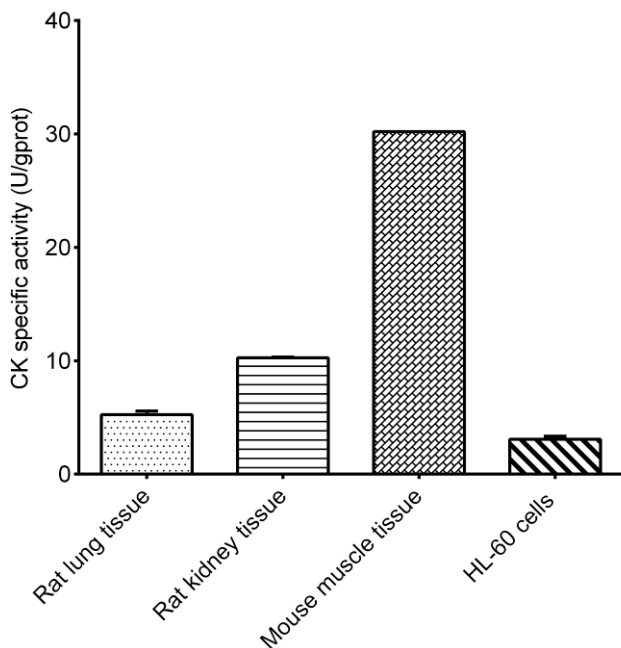
例如检测大鼠肺组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肺组织上清液10 μL按操作表操作, 结果如下:

测定孔A<sub>1</sub>值为0.404, 测定孔A<sub>2</sub>值为0.438, 测量10%大鼠肺组织匀浆的蛋白含量7.97gprot/L, 计算结果为:

$$\text{CK 活力 (U/gprot)} = \frac{0.438 - 0.404}{5 \times 0.6 \times 6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{0.23}{0.01} \div 7.97 = 5.26 \text{ U/gprot}$$

按照操作过程, 测定大鼠肺组织(10%组织匀浆的蛋白浓度7.97 gprot/L, 加样量10 μL)、大鼠肾组织(10%组织匀浆的蛋白浓度8.82 gprot/L, 加样量10 μL)、小鼠肌肉组织(10%组织匀浆的蛋白浓度3.51 gprot/L, 加样量10 μL)和HL-60(1×10<sup>6</sup>个细胞匀浆的蛋白浓度10.85 gprot/L, 加样量10 μL)中CK活力(如下图):



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

#### 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。