

(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-S

产品规格: 50 assays(48 samples)/100 assays(96 samples)

检测仪器: 紫外-可见光分光光度计 (340 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

网址: 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、血浆、动物组织、细胞等中肌酸激酶活力。

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⁺生成 NADPH, 导致 340 nm 波长处吸光值增加。

本试剂盒检测组织样本时, 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。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	酶溶液 (Enzyme Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	酸溶液 (Acid Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 3 个月

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: 紫外-可见分光光度计 (340 nm)、涡旋混匀仪、37°C恒温箱、微量移液器 (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L)

耗材: 枪头 (1000 μ L, 200 μ L)、EP 管 (2 mL)、吸水纸、擦镜纸

试剂: 双蒸水、PBS (0.01 M, pH 7.4)

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 将试剂二，37°C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：组织样本匀浆介质为 PBS (0.01 M, pH 7.4)，匀浆离心后取上清，一部分上清液进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 细胞加入 200 μ L PBS (0.01 M, pH 7.4) 匀浆处理，离心后取上清，一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：3.7 U/L-160 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	HepG2 细胞匀浆	不稀释
人血浆	不稀释	10%大鼠肾匀浆	不稀释
小鼠血清	不稀释	10%大鼠脑匀浆	2-5
大鼠血清	不稀释	10%大鼠肝匀浆	2-10

注：样本稀释液为 PBS (0.01 M, 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 取用试剂一时，不能将移液器直接伸入试剂瓶中，避免污染试剂。

操作步骤

- ① 空白管：取 1000 μL 试剂一，加入 2 mL 的 EP 管中。
测定管：取 1000 μL 试剂一，加入 2 mL 的 EP 管中。
- ② 向步骤①中的空白管，加入 50 μL 双蒸水；
向步骤①中的测定管，加入 50 μL 待测样本。
- ③ 充分混匀，37°C 孵育 5 min。
- ④ 向步骤③中，加入 100 μL 已经温预 10 min 的试剂二。
- ⑤ 充分混匀，37°C 孵育 2 min。
- ⑥ 340 nm，1 mL 石英比色皿（比色皿预热 10 min），空白管调零，测定管测定 OD 值为 A_1 ，37°C 中反应 5 min 后，测定 OD 值为 A_2 ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

操作表

	空白管	测定管
试剂一 (μL)	1000	1000
双蒸水 (μL)	50	--
样本 (μL)	--	50
充分混匀，37°C 温育 5 min		
试剂二（已温育 10 min） (μL)	100	100
充分混匀，37°C 孵育 2 min。340 nm，1 mL 石英比色皿（比色皿预热 10 min），空白管调零，测定管测定 OD 值为 A_1 ，在 37°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°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 1 μmol 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{CK 活性 (U/L)} = \frac{\Delta A}{t \times 1 \times \varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \times f$$

组织或细胞中 CK 活力计算：

定义：37°C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。

$$\text{CK 活性 (U/gprot)} = \frac{\Delta A}{t \times 1 \times \varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解：

ΔA : $A_2 - A_1$

t: 测定管在用空白管调零后，在 37°C 中反应时间（5 min）

l: 比色皿光径（1 cm）

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

$V_{\text{总}}$: 反应液的总体积（1.15 mL）

$V_{\text{样}}$: 样本体积（0.05 mL）

f: 样本检测前稀释的倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度（gprot/L）

附录1 关键数据

1. 技术参数

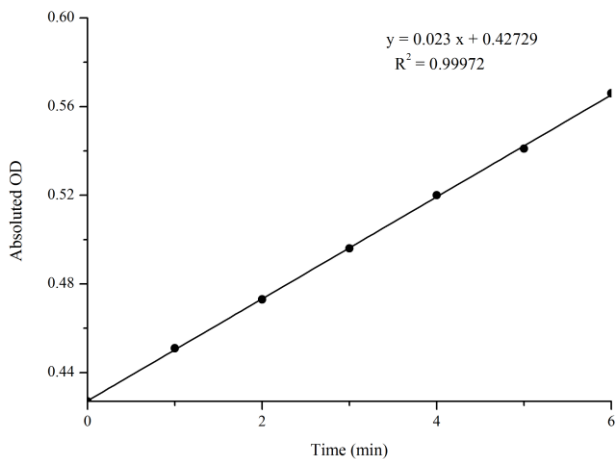
检测范围	3.7-160 U/L	平均批间差	8.1 %
灵敏度	3.7 U/L	平均批内差	5.2 %

2. 样本反应曲线(数据仅供参考)

①以大鼠肌肉为例，取2%大鼠肌肉匀浆50 μL ，按照操作表进行操作，记录测定OD值 A_1 后，在37°C中反应，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	0.427	0.451	0.473	0.496	0.520	0.541	0.566

②绘制反应曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

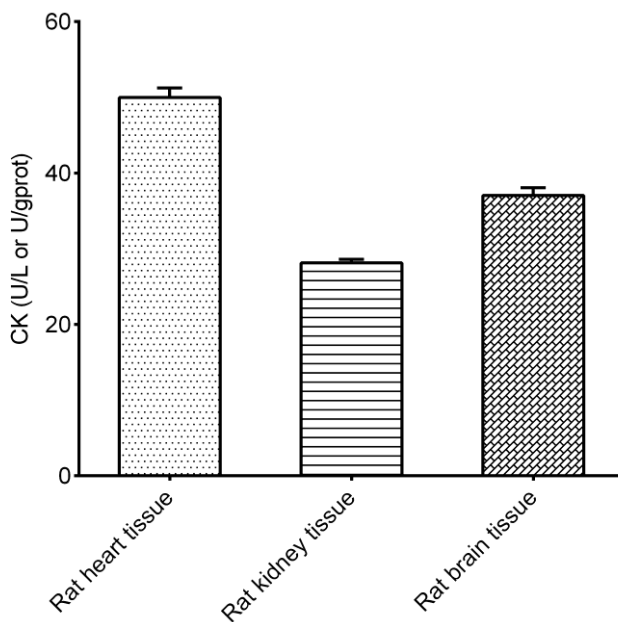
例如检测大鼠心脏组织(数据仅供参考):

将10%大鼠心组织匀浆用PBS (0.01 M, pH 7.4) 稀释2倍, 取50 μL 稀释后的大鼠心组织匀浆, 按操作表操作, 结果如下:

测定管0 min时平均OD值为0.474, 测定管5 min时平均OD值为0.681, 测量10%大鼠心组织匀浆的蛋白含量6.13 g/L, 计算结果为:

$$\text{CK (U/gprot)} = \frac{0.681-0.474}{5 \times 1 \times 6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{1.15}{0.05} \div 6.13 \times 2 = 49.95 \text{ U/gprot}$$

按照操作过程, 测定大鼠心脏组织 (10%组织匀浆的蛋白含量6.13 g/L, 稀释2倍, 加样量50 μL)、大鼠肾脏组织 (10%组织匀浆的蛋白含量7.84 g/L, 加样量50 μL)、和大鼠脑组织 (10%组织匀浆的蛋白含量4.66 g/L, 稀释2倍, 加样量50 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
样本测量结果>160 U/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长
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。