

肌酸激酶活性检测试剂盒48样

规格：微量法 48样

编号：JLC_K14860

检测原理：NADPH速率法

检测波长：340nm

注意

1、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60mL×1瓶，4°C保存；

试剂一：液体12mL×1瓶，4°C避光保存（可保存3个月）；

试剂二：液体2mL×1瓶，4°C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（10⁴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°C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℃，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂二37℃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℃孵育5min | |
| 试剂二（已预热10min） | 20 |
| 混匀，记录37℃，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 ΔA 小于0.05，可延长反应时间或增加样本量。如果 ΔA 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℃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 $1\mu\text{mol}$ 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℃条件下，每克组织每分钟使反应体系中底物NADPH的浓度改变 $1\mu\text{mol}$ 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10⁴个细胞或细菌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。

CK活性 (U/10⁴ cell) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{细提}} \div \text{细胞数量} \div T$

ε: NADPH在340nm处的微摩尔吸光系数, 6.22×10⁻³L/(μmol·cm)

d: 96孔酶标板的光径, 0.6cm

V_总: 反应总体积, 0.23mL;

V_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。 V_样: 液体样本体积, mL。

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。