

肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

CK(EC 2.7.3.2)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 之间的磷酸基反应，在能量运转、肌肉收缩和 ATP 再生中有重要作用，是临床诊断心脑血管疾病的一个重要指标。

测定原理：

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⁺生成 NADPH，导致 340nm 光吸收值增加。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂 1 瓶，4℃ 避光保存，使用前加 10mL 蒸馏水溶解。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

工作液：临用前根据用量将试剂一和试剂二以 1:1 混合。使用前 37℃ 温育 2min。

粗酶液提取：

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。
2. 血清样本：直接测定。

测定操作表：

1. 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。
2. 在 96 孔板中加入 40μL 样本和 60μL 蒸馏水，最后加入 100μL 工作液，立即混匀，37℃ 下测定初始吸光值 A1 与 1min 后的吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

CK 活性计算公式：

(1) 按组织蛋白含量计算

酶活定义：37℃，pH7.0 时，每毫克蛋白质 1min 内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按组织样本质量计算：

酶活定义：37℃，pH7.0 时，每克样品 1min 内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按血清计算：

酶活定义：37℃，pH7.0 时，每升血清 1min 内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

ε ：NADPH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：反应体系中样本体积，0.04mL；T，反应时间，1min；C_{pr}：样本蛋

白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

注意事项:

1. 配制好的工作液 4℃ 稳定 7 天, 请配制后尽快使用。
2. 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。
3. 样品蛋白质含量需要另外测定, 可选用 BCA 蛋白含量测定试剂盒进行测定。
4. OD 值大于 0.5 可用提取液适当稀释样品, 并在计算公式中相应的改变稀释倍数。