

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 之间的转磷酸基反应，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、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/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. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。
2. 操作表

	空白管	测定管
酶液 (μL)		60
工作液 (μL)	150	150
H ₂ O (μL)	150	90

混匀，取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中，空白管调零，测定 340nm 的初始值 A₁，37℃ 反应 3min，分别测定 1min，2min，3min 时的吸光值 A₂，计算时取平均值， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：空白管只需测定一次。

CK 活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (nmol/min/ mg prot)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 804 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 804 \times \Delta A \div W$$

(3) 按血清计算：

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

$$\text{CK 活性 (nmol/min/L)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 1000 = 804000 \times \Delta A$$

ϵ ：NADPH 微摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，0.3mL；V 样：反应体系中样本体积，0.06mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g

a. 用 96 孔板计算公式如下

(1) 按组织蛋白含量计算

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

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

(2) 按组织样本质量计算：

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

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

(3) 按血清计算：

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

$$\text{CK 活性 (nmol/min/L)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 1000 = 1608000 \times \Delta A$$

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，0.3mL；V 样：反应体系中样本体积，0.06mL；Cpr：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°C 稳定 7 天，请尽量配制后尽快使用。
2. 血清的 CK 不稳定，采集样本后尽快测定，4°C 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。