

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、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°C保存。

试剂一：粉剂1瓶，4°C避光保存，使用前加10mL蒸馏水溶解。

试剂二：液体10mL×1瓶，4°C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°C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°C，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°C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°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。

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

(2) 按组织样本质量计算：

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

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

(3) 按血清计算：

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

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

\square ：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；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。

www.affandi-e.com