

## 肌酸激酶（Creatine Kinase, CK）测定试剂盒说明书

（紫外分光法 48 样）

### 一、产品简介：

肌酸激酶（CK，EC 2.7.3.2）主要存在于心脏、肌肉及脑等组织中，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。

CK 催化磷酸肌酸和 ADP 生成肌酸和 ATP，通过添加的己糖激酶与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶复合体，依次催化 ATP 的水解并与伴随着 NADPH 的生成，通过检测 NADPH 在 340nm 处吸光值的增加即可得出 CK 酶活性的大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求    | 备注                                |
|------|-------------|---------|-----------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                   |
| 试剂一  | 粉剂×1 支      | 4℃ 保存   | 临用前甩几下，使粉剂落到底部，再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。  |
| 试剂二  | 粉剂×1 支      | -20℃ 保存 | 临用前甩几下，使粉剂落到底部，再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。  |
| 试剂三  | 液体 16mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                   |
| 试剂四  | 粉剂×4 支      | 4℃ 保存   | 临用前甩几下，使粉剂落到底部，每支加 0.3mL 蒸馏水充分溶解。 |

### 三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、低温离心机、可调式移液器、恒温培养箱、研钵。

### 四、肌酸激酶（CK）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至 EP 管中，12000rpm, 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min，设定温度至 37℃，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂可预先在 37℃ 条件下预温 5min。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ） | 测定管 |
|-----------------------|-----|
| 样本                    | 80  |
| 试剂一                   | 20  |

|   |     |
|---|-----|
| 试剂二   | 20  |
| 试剂三   | 560 |
| 37°C条件下孵育 20min,  |     |
| 试剂四   | 20  |
| 混匀, 37°C条件下, 立即于 340nm 处读取 A1, 15min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

【注】1.若 A 测定大于 1.5, 则可减少反应时间 T (如减至 10min) 再读取 A2, 或减少样本加样量 V1 (如减至 40 $\mu$ L, 则试剂三相应增加), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若  $\Delta A$  的值小于 0.01, 则可增大样本体积 V1 (如增至 160 $\mu$ L 或更多, 则试剂三相应减少), 或延长反应时间 T (如增至 30min 或更长), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

### 1、按组织蛋白含量计算:

定义: 37°C条件下, 每毫克蛋白质在每分钟内催化产生 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 93.8 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按组织样本质量计算:

定义: 37°C条件下, 每克样品在每分钟内催化产生 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \div V \times W) \div T = 93.8 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细胞数量计算:

定义: 37°C条件下, 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟内催化产生 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.19 \times \Delta A$$

### 4、按血清计算:

定义: 37°C条件下, 每毫升液体在每分钟内催化产生 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 93.8 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.08mL;

V2---反应体系总体积, 7 $\times 10^{-4}$  L;

d---光径, 1cm;

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$  L/mol/cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 15min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。