

组织及血液肌酸激酶（CK）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC2-C48	组织及血液肌酸激酶（CK）试剂盒	48T	常量法

产品说明：

肌酸激酶（Creatine Kinase, CK）（EC 2.7.3.2）也成为肌酸磷酸激酶，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，是一个与细胞能量运转、肌肉收缩、ATP再生有直接关系的重要激酶。

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，以此来表示CK酶活。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加 10 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 2、试剂二：临用前加入0.5 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 3、试剂三：临用前取 1 支加入0.5 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 4、试剂四：临用前加入0.65 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
- 5、工作液：临用前根据用量将试剂一、试剂二、试剂三、试剂四、试剂五以 70:4:7:10:90 的比例混合（体积比）。现用现配。使用前室温孵育 20min（该步骤不可省略）。

操作步骤：

一、样本处理

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，取上清，置冰上待测。
2. 血清样本：直接测定。
3. 细胞样本：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液）加入提取液，冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后于4℃，10000g离心10min，取上清待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，用蒸馏水调零。

2、操作表：在1mL比色皿中加入下列试剂

	空白管	测定管
样本 (μL)		200
工作液 (μL)	450	450
H ₂ O (μL)	550	350

在1mL石英比色皿中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃ 水浴3min，拿出迅速擦干测定190s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A2测定-A1测定，ΔA空白管=A2空白-A1空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。（空白管只需做1-2次）

三、CK 活性计算

1、按组织蛋白浓度计算：

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

$$\text{CK活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按组织样本质量计算：

酶活定义：37℃， pH7.0 时，每克样本每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{CK活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 268 \times \Delta A \div W$$

3. 按血清体积计算：

酶活定义：37℃， pH7.0 时，每mL血清每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{CK活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 268 \times \Delta A$$

4. 按细胞数量计算：

酶活定义：37℃， pH7.0 时，每1万个细胞每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{CK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

ε: NADPH的摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, 0.001L; V样: 反应体系中样本体积, 0.2mL; V样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 细胞数量: 以10⁴为单位, 万个; T: 反应时间, 3min; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

注意事项：

1. 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。
2. 样本蛋白质含量需要另外测定。
3. OD 值大于0.6 可用提取液适当稀释样本，并在计算公式中相应的改变稀释倍数。
4. ΔA 空白管一般不超过0.01。