

## 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-M96	组织及血液肌酸激酶（CK）试剂盒	96T	微量法

### 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<sup>+</sup>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 110 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×1支	-20℃保存
试剂四	粉剂×1支	-20℃保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存

### 溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加 5 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（10<sup>4</sup>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/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，用蒸馏水调零。

- 2、操作表：在微量石英比色皿/96孔板中加入下列试剂

	空白管	测定管
样本（μL）		40
工作液（μL）	90	90
H <sub>2</sub> O（μL）	110	70

在微量石英比色皿/96孔UV板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A<sub>1</sub>，迅速置于37℃水浴或者培养箱3min（有控温功能的酶标仪可以设置唯独为37℃），拿出迅速擦干测定190s时的吸光值A<sub>2</sub>，计算ΔA测定管=A<sub>2</sub>测定-A<sub>1</sub>测定，ΔA空白管=A<sub>2</sub>空白-A<sub>1</sub>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、按微量石英比色皿计算

- (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。CK活性（U/mg prot）=  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

- (2) 按组织样本质量计算：

酶活定义：37℃，pH7.0时，每克样本每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。CK活性（U/g 质量）=  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 268 \times \Delta A \div W$

- (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。CK活性（U/mL）=  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 109 \div V_{\text{样}} \div T = 268 \times \Delta A$

- (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。

CK活性（U/10<sup>4</sup> cell）=  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$

$\epsilon$ ：NADPH的摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup>L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，2×10<sup>-4</sup>L；V样：反应体系中样本体积，0.04mL；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10<sup>4</sup>为单位计算，万个；T：反应时间，3min；109：单位换算系数，1mol=109nmol。

- 2、按96孔UV板计算

将上述公式中的d=1cm改为0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

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。