

肌酸激酶（Creatine Kinase, CK）测定试剂盒说明书

（货号:BP10445W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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 的水解与并伴随着 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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃ 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 4 支	4℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.3mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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（10⁴）：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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，设定温度至 37℃，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂可预先在 37℃条件下预温 5min，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
37℃条件下孵育 20min,	
试剂四	10
混匀，37℃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 5μL，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 ΔA 的值小于 0.01，则可增大样本体积 V1（如增至 80μL 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℃条件下，每毫克蛋白质在每分钟内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 214.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按组织样本质量计算：

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

$$\text{CK 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \div V \times W) \div T = 214.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

定义：37℃条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟内催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{CK 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.43 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

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

$$\text{CK 活性(nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 214.4 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。