

肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 活性测定说明书

(货号: ADS-F-FM038-24 分光法 24 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。

肌酸激酶 (CK) 催化三磷酸腺苷和肌酸生成磷酸肌酸, 后者很快全部水解为磷酸, 但是三磷酸腺苷和生成的二磷酸腺苷仍很稳定; 通过定磷试剂来测定磷酸肌酸水解出的磷酸含量检测 CK 酶活性大小。

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	提取液 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解 (可超声溶解)。
试剂二	粉体 1 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解。
试剂三	液体 23mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 2.9mL 的 B 液, 再加 37.1mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

【注】: 全程操作需无磷环境; 试剂配置最好用新枪头和玻璃移液器等, 避免磷污染。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器。

四、肌酸激酶 (CK) 活性检测:

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。4℃×12000rpm 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): 提取液体积 (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, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上调至 700nm, 试剂解至室温 (25℃), 蒸馏水调零。
- ② 试剂一和二和三可按照 20:20:210 预先配成混合液 (现配现用); 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	20	20

试剂二	20	20
试剂三	460	460
样本	100	
37°C 孵育 30min		
试剂四	80	80
样本		100
混匀，8000rpm，4°C离心 5min，上清液待测。		

③ 显色反应，在 EP 管中直接加入：

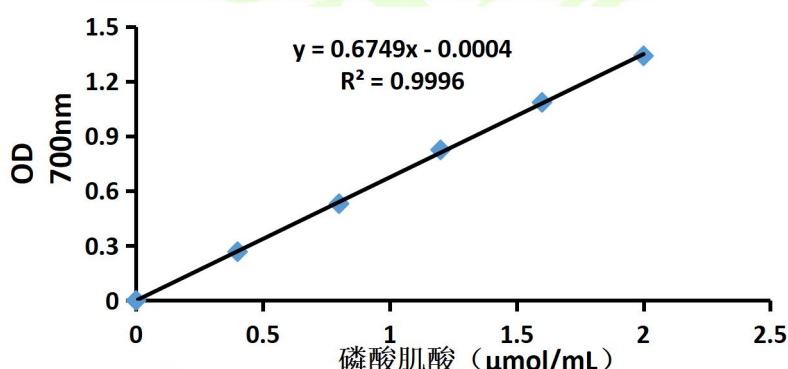
上清液	150	150
试剂五	600	600
混匀，室温静置 10min，若浑浊则可 8000rpm，4°C 或室温离心 5min，取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1.若 ΔA 低于 0.01 可增加②步中样本加样体积 V_1 (如增至 200 μ L，则试剂三相应减少，总反应体系不变)，或延长 37°C 孵育时间 T （如增至 60min）；或增加取样质量 W ；则改变后的 V_1 和 T 和 W 需代入公式计算。

2.若 A 大于 1.2，可用蒸馏水对③步中上清液稀释，则稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.6749x - 0.0004$ ， x 是标准品摩尔浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白产生 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$)= $[(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 20.2 \times (\Delta A + 0.0004) \div C_{\text{pr}}$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织产生 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/g 鲜重}$)= $[(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 20.2 \times (\Delta A + 0.0004) \div W$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞产生 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}$)= $[(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.04 \times (\Delta A + 0.0004)$

5、按液体体积计算：

定义：每小时每毫升液体产生 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mL}$)= $[(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V_2] \div V_1 \div T = 20.2 \times (\Delta A + 0.0004)$

V ---加入提取液体积，1mL；

V_1 ---加入样本体积，0.1mL；

W ---样本鲜重，g；

V_2 ---酶促反应总体积，0.68mL；

T ---反应时间，1/2 小时；

500---细菌或细胞总数，500 万；

C_{pr} ---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（20 μ mol/mL）：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. μ mol/mL。
- 3 依据③步中显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。

