

## 肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 活性测定说明书

(货号: ADS-W-FM038-48 微板法 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。

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 60mL×1 瓶             | 4°C保存   |                                                                       |
| 试剂一  | 粉体 1 支                   | 4°C保存   | 用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解 (可超声溶解)。                                 |
| 试剂二  | 粉体 1 支                   | -20°C保存 | 用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解。                                         |
| 试剂三  | 液体 22mL×1 瓶              | 4°C保存   |                                                                       |
| 试剂四  | 液体 5mL×1 瓶               | 4°C保存   |                                                                       |
| 试剂五  | A:粉体 2 瓶<br>B:液体 4mL×1 瓶 | 4°C保存   | 临用前在一瓶试剂 A 中加 1.8mL 的 B 液, 再加 23.2mL 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°C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:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 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°C×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°C 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, 离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 700nm, 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- 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                          | 210 | 210 |
| 样本                           | 50  |     |
| 37°C 孵育 30min                |     |     |
| 试剂四                          | 40  | 40  |
| 样本                           |     | 50  |
| 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：

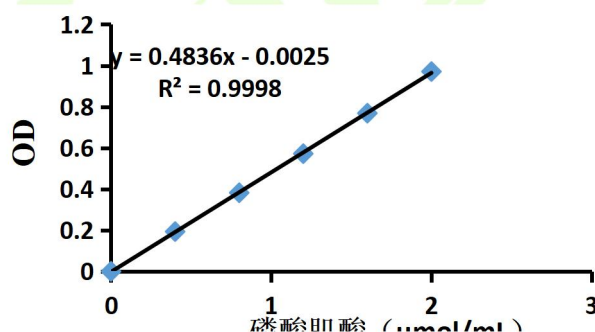
|                                                                                                                                          |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                                                                      | 100 | 100 |
| 试剂五                                                                                                                                      | 400 | 400 |
| 混匀，室温静置 10min，若浑浊则可 8000rpm，4°C或室温离心 5min，取 250μL 澄清液体至 96 孔板中，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 $\Delta A$  低于 0.01 可增加②步中样本加样体积  $V_1$ (如增至 100μL，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： $y = 0.4836x - 0.0025$ ， $x$  是标准品摩尔浓度（μmol/mL）， $y$  是 $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白产生 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mg prot)=[ $(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2$ ]  $\div$  ( $V_1 \times C_{pr}$ )  $\div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025) \div C_{pr}$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织产生 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/g 鲜重)=[ $(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2$ ]  $\div$  ( $W \times V_1 \div V$ )  $\div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025) \div W$

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 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h /10<sup>4</sup> cell)=[ $(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2$ ]  $\div$  ( $500 \times V_1 \div V$ )  $\div T = 0.056 \times (\Delta A + 0.0025)$

5、按液体体积计算：

定义：每小时每毫升液体产生 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mL)=[ $(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2$ ]  $\div V_1 \div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025)$

$V$ ---加入提取液体积，1mL；

$V_1$ ---加入样本体积，0.05mL；  $W$ ---样本鲜重，g；

$V_2$ ---酶促反应总体积，0.34mL；

$T$ ---反应时间，1/2 小时；

500---细菌或细胞总数，500 万；

Cpr---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 $\mu$ 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.  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 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。