

## 肌酸激酶（Creatine Kinase, CK）活性测定说明书

（分光法 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℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃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 mg×1 支	-20℃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）。
试剂三	液体 46mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 5mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 4.6mL 的 B 液，再加 59.4mL 的蒸馏水，混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×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（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 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（ $\mu\text{L}$ ）	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:

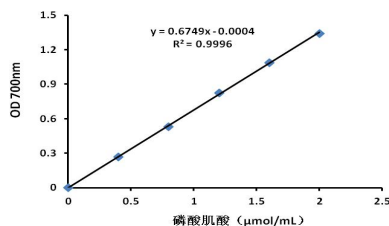
上清液	150	150
试剂五	600	600
混匀, 室温静置 10min, 若浑浊则可 8000rpm, 4°C 或室温离心 5min, 取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 若  $\Delta A$  低于 0.01 可增加②步中样本加样体积  $V_1$  (如增至 200 $\mu$ 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  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白产生 1 $\mu\text{mol}$  磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织产生 1 $\mu\text{mol}$  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 $\mu\text{mol}$  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 $\mu\text{mol}$  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 $\mu\text{mol/mL}$ ): 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.  $\mu\text{mol/mL}$ 。

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。