

肌酸激酶（Creatine Kinase, CK）活性测定说明书

（微板法 96 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 120mL×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 4.2mL 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 4.2mL 蒸馏水溶解（可超声溶解）。
试剂三	液体 44mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 mg×2 瓶 B:液体 6.5mL×1 瓶	4℃保存	临用前在一瓶试剂 A 中加 3.24mL 的 B 液，再加 41.76mL 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：

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℃×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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。

- 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:

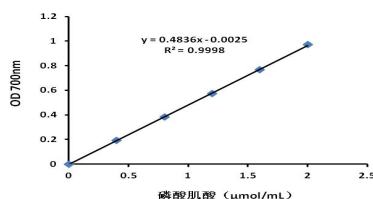
上清液	100	100
试剂五	400	400
混匀, 室温静置 10min, 若浑浊则可 8000rpm, 4°C 或室温离心 5min, 取 250 μ L 澄清液体至 96 孔板中, 于 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A=A$ 测定-A 对照(每 个样本做一个自身对照)。		

【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 100 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: $y = 0.4836x - 0.0025$, 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($\mu\text{mol/h/mg prot}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025) \div C_{pr}$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织产生 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

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

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 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.056 \times (\Delta A + 0.0025)$

5、按液体体积计算:

定义: 每小时每毫升液体产生 1 μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mL}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V_2] \div V_1 \div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025)$

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;

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. $\mu\text{mol/mL}$ 。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。