

肌酸激酶（Creatine Kinase, CK）活性测定说明书

（货号：BP10446W 微板法 96 样 有效期：3 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。

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.2mL 蒸馏水溶解（可超声溶解）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.2mL 蒸馏水溶解（可超声溶解）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
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 2 瓶 B:液体 12mL×1 瓶	4℃ 避光保存	每瓶： 1. 临用前在一瓶试剂 A 中加 5.14mL 的 B 液，再加 39.86mL 蒸馏水混匀溶解备用； 2. 需避光，现配现用，变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃ 避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；溶解后的标品一周内用完。

【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、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。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 (10^4)：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、检测步骤：

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：

试剂组分 (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℃ 孵育 30min		
试剂四	40	40
样本		50
混匀，8000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。		

③ 显色反应，在

EP 管中直接加入：

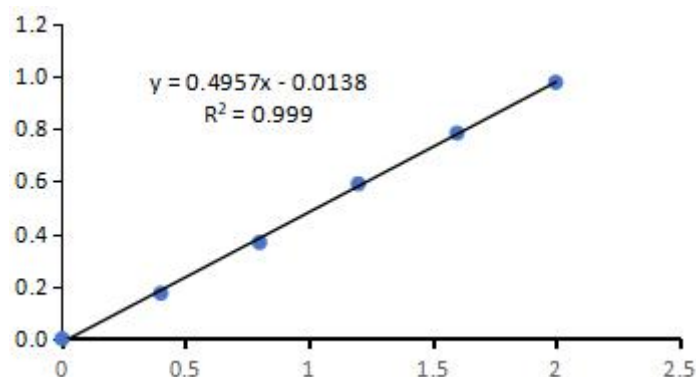
上清液	100	100
试剂五	400	400
混匀，室温静置 10min，若浑浊则可 8000rpm，4℃或室温离心 5min，取 250μL 澄清液体至 96 孔板中，于 700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【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 100μL，则试剂三相应减少，总反应体系不变)，或延长 37℃ 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： $y = 0.4957x - 0.0138$ ， 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 $1\mu\text{mol}$ 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力 ($\mu\text{mol/h/mg prot}$) = $[(\Delta A + 0.0138) \div 0.4957 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 27.44 \times (\Delta A + 0.0138) \div C_{\text{pr}}$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织产生 1 μ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μ mol/h/g 鲜重)=[($\Delta A+0.0138$) $\div 0.4957 \times V_2$] $\div (W \times V_1 \div V) \div T=27.44 \times (\Delta A+0.0138) \div W$

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 μ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μ mol/h /10⁴ cell)=[($\Delta A+0.0138$) $\div 0.4957 \times V_2$] $\div (500 \times V_1 \div V) \div T=0.055 \times (\Delta A+0.0138)$

5、按液体体积计算：

定义：每小时每毫升液体产生 1 μ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μ mol/h/mL)=[($\Delta A+0.0138$) $\div 0.4957 \times V_2$] $\div V_1 \div T=27.44 \times (\Delta A+0.0138)$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.05mL；

W---样本鲜重，g；

V2---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 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 20 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 2 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据③步中显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水		100
试剂五	400	400
混匀，室温静置 10min，若浑浊则可 8000rpm，4 $^{\circ}$ 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-0 浓度管。		