

**肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 活性测定试剂盒****( 分光法 48 样 )****产品简介:**

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。

**试剂盒组成和配制:**

试剂名称	规格	保存要求	备注
	60mL× 1	4	
	mg× 1	4	2.2mL
	mg× 1	-20	2.2mL
	46mL× 1	4	
	9mL× 1	4	
	A: mg× 1	4	A 4.6mL B 59.4mL
	B: 5mL× 1		

	mg× 1	4	
--	-------	---	--

**【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。

## 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。

## 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
	20	20
	20	20
	460	460
	100	
37                      30min		
	80	80
		100
8000rpm 4                      5min		

③ 显色反应，在 EP 管中直接加入：

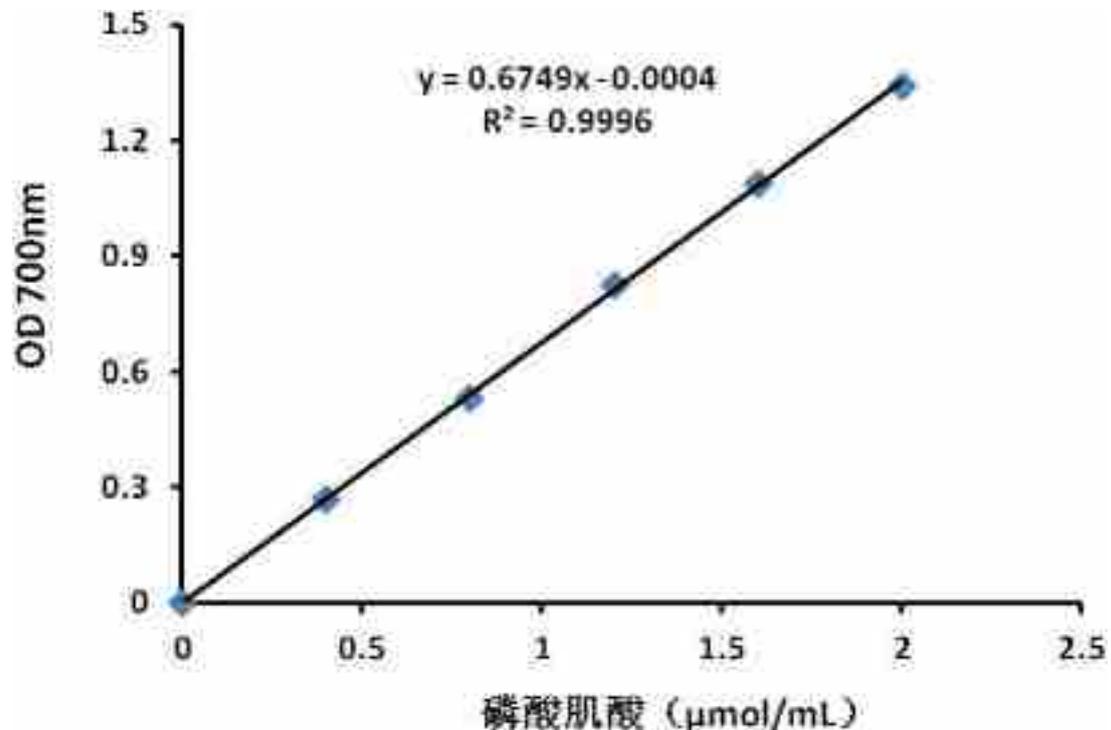
	150	150
	600	600
10min	8000rpm 4	5min
1mL	1cm	700nm
A=A	-A	

**[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 $\mu\text{L}$ ，则试剂三相应减少，总反应体系不变)，或延长 37 $^{\circ}\text{C}$  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。

## 结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.6624x - 0.003$ ,  $x$  是标准品摩尔质量 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  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 ( $\mu\text{mol/h/mg prot}$ ) =  $[(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 20.2 \times (\Delta A + 0.0004) \div Cpr$ 。

### 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 ( $\mu\text{mol/h/g 鲜重}$ ) =  $[(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 20.2 \times (\Delta A + 0.0004) \div W$ 。

### 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 $\mu$ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\mu$ mol/h /10<sup>4</sup> cell)=[( $\Delta$ A+0.0004) $\div$ 0.6749 $\times$ V2] $\div$ (500 $\times$ V1 $\div$ 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 $\mu$ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\mu$ mol/h/mL)=[( $\Delta$ A+0.0004) $\div$ 0.6749 $\times$ V2] $\div$ V1 $\div$ T=20.2 $\times$ ( $\Delta$ A+0.0004)

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.1mL ; W---样本鲜重, g;

V2---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;

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。
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。