

肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 活性测定说明书

(货号: BN72291 微板法 48 样)

一、产品简介:

肌酸激酶 (CK) 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 mg×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 mg×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 mg×2 瓶 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。
标准品	粉体 mg×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 (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°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

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

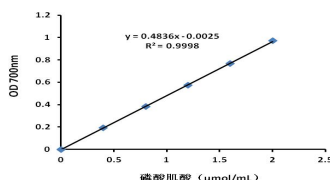
试剂三	210	210
样本	50	
37°C 孵育 30min		
试剂四	40	40
样本		50
混匀, 8000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测。		

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)。		

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 $1\mu\text{mol}$ 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025) \div Cpr$

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($\mu\text{mol/h/g 鲜重}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025) \div W$

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 $1\mu\text{mol}$ 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.056 \times (\Delta A + 0.0025)$

5、按液体体积计算:

定义: 每小时每毫升液体产生 $1\mu\text{mol}$ 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mL}$)= $[(\Delta A + 0.0025) \div 0.4836 \times V2] \div V1 \div T = 28.12 \times (\Delta A + 0.0025)$

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 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 以上面不同浓度点为横坐标 (x), 对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y) 绘制标准曲线, 得到线性回归方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中计算 x ($\mu\text{mol/mL}$)。