

Creatine Kinase Activity Kit

肌酸激酶（CK）测定试剂盒说明书（定磷法）

货号:BN72294| 方法: 可见分光法 | 规格: 24 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 30mL×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 1.2mL 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 1.2mL 蒸馏水溶解。
试剂三	液体 23mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 2.9mL 的 B 液，再加 37.1mL 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（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 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 (μL)	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。		

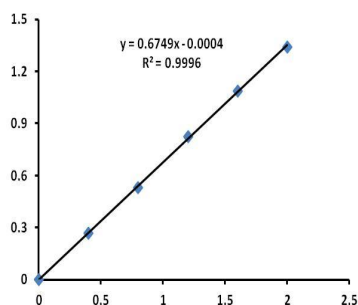
③ 显色反应, 在 EP 管中直接加入:

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)。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

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 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

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

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 20.2 \times (\Delta A + 0.0004) \div W$$

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 μ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.6749 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.04 \times (\Delta A + 0.0004)$$

5、按液体体积计算：

定义：每小时每毫升液体产生 1 μ mol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

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

V---加入提取液体积，1mL；

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。