

肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 活性测定说明书

(货号: G0882W96 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°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 4.2mL 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 4.2mL 蒸馏水溶解 (可超声溶解)。
试剂三	液体 44mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 9mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	A: 粉体 mg×2 瓶 B: 液体 6.5mL×1 瓶	4°C 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°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 (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、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

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:

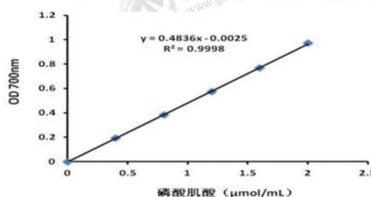
上清液	100	100
试剂五	400	400
混匀, 室温静置 10min, 若浑浊则可 8000rpm, 4°C 或室温离心 5min, 取 250μL 澄清液体至 96 孔板中, 于 700nm 下读取各管吸光值, ΔA=A 测定-A 对照(每 个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 若 ΔA 低于 0.01 可增加②步中样本加样体积 V1(如增至 100μL, 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 V1 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 (μmol/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 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mg prot)=[(ΔA+0.0025)÷0.4836×V2]÷(V1×Cpr)÷T=28.12×(ΔA+0.0025)÷Cpr

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织产生 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0025)÷0.4836×V2]÷(W×V1÷V)÷T=28.12×(ΔA+0.0025)÷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 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/10⁴ cell)=[(ΔA+0.0025)÷0.4836×V2]÷(500×V1÷V)÷T=0.056×(ΔA+0.0025)

5、按液体体积计算:

定义: 每小时每毫升液体产生 1μmol 磷酸肌酸的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mL)=[(ΔA+0.0025)÷0.4836×V2]÷V1÷T=28.12×(ΔA+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 (20μmol/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. μmol/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。