



肌酸激酶 (CK) 测定试剂盒

(货号：BC112 比色法 50 管/24 样)

一、测定原理：

肌酸激酶(Creatine Kinase, 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，此时三磷酸腺苷和二磷酸腺苷仍稳定，加入钼酸铵可生成磷钼酸，可进一步还原成钼蓝，根据生成无机磷的量可算出酶的活力。

二、试剂组成与配制：(试剂盒有效期 6 个月)

试剂一：液体 6mL×1 瓶，冷冻或者 4℃保存。

试剂二：液体 1.5mL×1 瓶，冷冻或者 4℃保存。

试剂三：粉剂 2 支，临用时每支加双蒸水 2 mL，4℃保存。(注:粉剂量较少,可能附着于管壁或盖子上,并非空管,如使用时肉眼不可见,可将其 4000 转/分钟离心 2 分钟后使用)

试剂四：粉剂 1 支，临用前每支加双蒸水 6mL 溶解（溶解较慢，可持续涡旋混匀使其溶解），4℃保存。

试剂五：粉剂 2 支，冷冻保存，临用时每支加双蒸水 2mL。配好后 -20℃以下保存 5 天。

试剂六：液体 6mL×1 瓶，室温或 4℃保存。

试剂七：粉剂×1 瓶，4℃保存，加双蒸水 60mL，可适当加热溶解，溶解后即为试剂七应用液，4℃保存。

试剂八：粉剂×2 瓶，4℃保存，临用时每支加双蒸水 20mL，溶解后即为试剂八应用液 4℃保存，颜色变深后弃用。

2.5mol/L 硫酸：50mL×1 瓶,室温保存。

附带双蒸水 100mL×2 瓶，供配制试剂时用。

定磷剂的配制：试剂七应用液：试剂八应用液：双蒸水：2.5mol/L 硫酸 = 1 : 1 : 2 : 1。配好的定磷剂应为浅黄色，若无色则失效，若呈蓝色则为磷污染，定磷剂需现用现配。配好后 4℃可保存 48 小时。

三、所需仪器及试剂：

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿，涡旋混匀器，离心机，37-45℃水浴锅或恒温箱，烧杯，蛋白测定试剂（组织或细胞样本用，本公司有售）。

四、操作过程：

1、样本前处理：

血清（浆）等液体样本：直接取样（预试后）测定；

组织样本：准确称取组织重量，按重量(g)：体积(mL)=1: 9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，制备成 10% 的组织匀浆，3500 转/分，离心 10 分钟取上清待测（上清液先预试，选取最佳取样浓度后再进行正式实验；另外，上清液还得测其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

培养细胞：收集细胞后，每份细胞（细胞数量尽量不要低于 10^6 个，越多越好）加入 0.3mL 的生理盐水，冰水浴下超声破碎（功率 200-300W，运行 5 秒，间隔 15 秒，反复 3-5 次），4000 转/分离心 10 分钟，取上清液待测（上清液先预试，选取最佳取样浓度后再进行正式实验；上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

2、操作表：(注意：配制好的试剂，需 37℃预温 5 分钟，再进行测定) (如果样本较多，也可以配制混合试剂：按试剂一:试剂二:试剂三应用液:试剂四应用液:试剂五应用液=8:2:5:10:5 的比例进行配制（混合试剂加 300μL 反应），用多少配多少，现用现配，试剂配制好，需 37℃ 预温 5 分钟，再进行测定)



	测定管	对照管
待测样本 (μL)	20	
试剂一 (μL)	80	80
试剂二 (μL)	20	20
试剂三应用液 (μL)	50	50
试剂四应用液 (μL)	100	100
试剂五应用液 (μL)	50	50
旋涡混匀, 37°C 水浴 20 分钟		
试剂六 (μL)	100	100
待测样本 (μL)		20
旋涡混匀, 离心 3500r/min×10min, 取上清定磷		
上清 (μL)	300	300
定磷剂 (μL)	2000	2000
混匀, 45°C 水浴 15 分钟, 双蒸水调零, 660nm 处 1cm 光径, 测各管的吸光度值。根据标准曲线计算 CK 的酶活力		

[注]: 预试详细参照《最佳取样浓度摸索》(本说明书第六点); 每个样本均需设定一个测定管和一个对照管。

3、计算公式:

①、血清计算公式:

$$\begin{aligned} \text{CK活力 (U/mL)} &= \frac{\text{根据标曲计算获得的CK酶活力 (U/mL)}}{N} \\ &= [7.4491 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) - 0.0716] \times N \end{aligned}$$

N: 样本测试前稀释倍数;

②、组织或细胞计算公式:

$$\begin{aligned} \text{CK活力 (U/mgprot)} &= \frac{\text{根据标曲计算获得的CK酶活力 (U/mL)}}{C_{\text{pr}}} \\ &= [7.4491 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) - 0.0716] \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

C_{pr}: 组织样本匀浆蛋白浓度, mgprot/mL(prot 表示蛋白)。

(标准曲线见附录 I)

[注]:试剂盒中没有带 CK 标准品, 用户按照操作表测定, 可以直接套用我们的公式, 但一定要注意, 测定所得一定要符合说明书第六点的要求 (绝对 OD 值控制在 0.05~0.5 之间)

4、计算举例:

例 1: 取小鼠血清 20μL 进行 CK 检测, 测得测定管吸光度为 0.352, 对照管吸光度为 0.278, 根据标准曲线拟合方程计算 CK 含量为:

$$\begin{aligned} \text{CK活力 (U/mL)} &= 7.4491 \times (0.352 - 0.278) - 0.0716 \\ &= 0.480 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

例 2: 取 2%大鼠肝匀浆上清液 20μL 进行 CK 检测, 测定管吸光度为 0.386, 对照管吸光度为 0.178, 2%大鼠肝匀浆的蛋白浓度为 2.268mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{CK活力 (U/mgprot)} &= [7.4491 \times (0.386 - 0.178) - 0.0716] \div 2.268 \\ &= 0.652 \text{ U/mgprot} \end{aligned}$$



ELK Biotechnology

Tel:+86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

ELK Biotechnology

例 3:取 5%中华鲟鳃匀浆上清液 20μL 进行 CK 检测, 测定管吸光度为 0.441, 对照管吸光度为 0.314, 5%中华鲟鳃匀浆的蛋白浓度为 0.6429mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{CK活力} &= [7.4491 \times (0.441 - 0.314) - 0.0716] \div 0.6429 \\ (\text{U/mgprot}) &= 1.36 \text{ U/mgprot} \end{aligned}$$

五、注意事项:

- 1、所有样品均要检测测定管及对照管。
- 2、组织匀浆 4℃存放不可超过 10 小时, 组织块冷冻可延长存放时间。
- 3、血清 4℃存放不可超过 10 小时, 冷冻可延长存放时间。
- 4、此法为微量, 灵敏, 快速法。所以对测定管子要求严格, 要没有一点磷的管子, 若放过 H₃PO₄ 或其缓冲盐的管子, 一定要洗得非常干净, 用洗涤剂加水煮, 再用自来水冲, 最后用双蒸水冲。**最好用一次性塑料管或者用新的玻璃管**。这样可以避免磷污染。这一点很重要, 常常是实验成败的关键因素。
- 5、定磷剂配好后, 不可放置太久, 一般 4℃可保存 48 小时, 最好现用现配。随时放冰箱。
- 6、大批量样本操作时, 最好采用简化操作法, 这样快捷、准确。
- 7、所有配试剂的器皿要专用, 或者用新的 (包括吸硫酸的吸管, 及盛双蒸水的器皿以及吸各种试剂的吸嘴)。

六、最佳取样浓度的摸索:

最佳取样浓度的摸索

注意: 因样品种类不同, 其最佳取样浓度不同。根据 CK 标准曲线(见附录), 在每测定一种新的样品前, 最好摸索一个最佳取样浓度, 一般把绝对 OD 值 (测定管 OD-对照管 OD 值) 控制在 0.2 左右 (大批量实验时绝对 OD 值在 0.05~0.4 之间均可)。

1、血清 (浆) 最佳取样浓度说明:

由于正常情况下血清 (浆) 中的 CK 活力比较低。但是如果用户的模型组的 CK 活力会明显增高, 那最好在批量实验前取模型组做个预试, 一旦 CK 活力 > 3.5U/mL, 就需要用生理盐水将该模型组血清稀释后检测。若含量太高 (曲线的平坦部分), 则看不出组与组之间的显著性差异。

2、组织匀浆最佳取样浓度说明:

如果您使用本试剂盒测试某一种新的样品时, 最好先做三支不同浓度的测试管。例如测肌肉组织匀浆, 取样浓度分别为 1%、2%、5%, 然后计算酶的浓度, 选取酶的浓度在 0.01 ~ 0.1mg/mL (即: 酶活力在 0.35 ~ 3.5U/mL, 此段曲线基本呈直线关系) 的样本浓度为最佳取样浓度, 进行批量实验。若浓度太高 (曲线的平坦部分), 则看不出组与组之间的显著性差异, 需将样品浓度稀释后再测试; 若浓度太低, 则实验误差对测定结果影响很大, 需将样品加大浓度后测试。

这样做对科研结果分析及 t 检验有很大帮助。



附录 I :CK 标准曲线的制备

1、试剂的配制：

取 CK 标准品 (70U/支, 本试剂盒不提供), 用双蒸水溶解并稀释成 0.175、0.350、0.700、1.050、1.400、1.750、2.100、2.450、2.800、3.150、3.500U/mL, 其它试剂的配制, 同前面的样本中 CK 测定试剂的配制。

[注]: 配制好的试剂, 需 37°C 预温 5 分钟, 再进行测定。

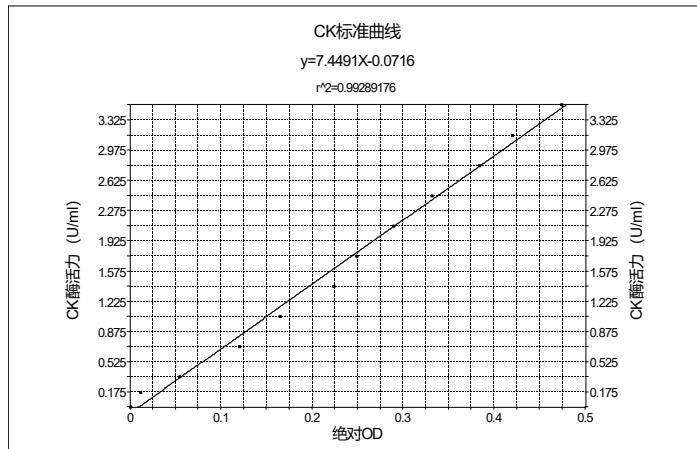
2、简化测定操作表:

	测定管	对照管
CK 标准品 (μ L)	20	
混合试剂 (μ L) (37°C 预温)	300	300
旋涡混匀, 37°C 水浴 20 分钟		
试剂六 (μ L)	100	100
CK 标准品 (μ L)		20
旋涡混匀, 离心 3500r/min×10min, 取上清定磷		
上清 (μ L)	300	300
定磷剂 (μ L)	2000	2000
旋涡混匀, 45°C 水浴 15 分钟, 双蒸水调零, 660nm 处 1cm 光径, 分光光度计测各管吸光度		

3、测定结果:

CK 酶活力 (U/mL)	0.175	0.35	0.7	1.05	1.4	1.75
对照 OD 值	0.276	0.276	0.283	0.288	0.288	0.289
测定 OD 值	0.287	0.33	0.403	0.453	0.512	0.538
绝对 OD 值	0.011	0.054	0.12	0.165	0.224	0.249
CK 酶活力 (U/mL)	2.1	2.45	2.8	3.15	3.5	
对照 OD 值	0.29	0.29	0.274	0.276	0.294	
测定 OD 值	0.58	0.622	0.658	0.698	0.768	
绝对 OD 值	0.29	0.332	0.384	0.422	0.474	

以 CK 标准品浓度 (U/mL) 为纵坐标, 以绝对 OD 值为横坐标, 作 CK 标准曲线, 绘图如下:



标准曲线用户仅供参考用户无需制作,按计算公式计算即可,如需制作,请自备标准品。

地址: 武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼