

# 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:

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

N: 样本测试前稀释倍数;

#### ②、组织或细胞计算公式:

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

Cpr: 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:

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

**例 3:**取 5%中华鲟鳃匀浆上清液 20 $\mu$ L 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:

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

#### 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  $\text{H}_3\text{PO}_4$  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。

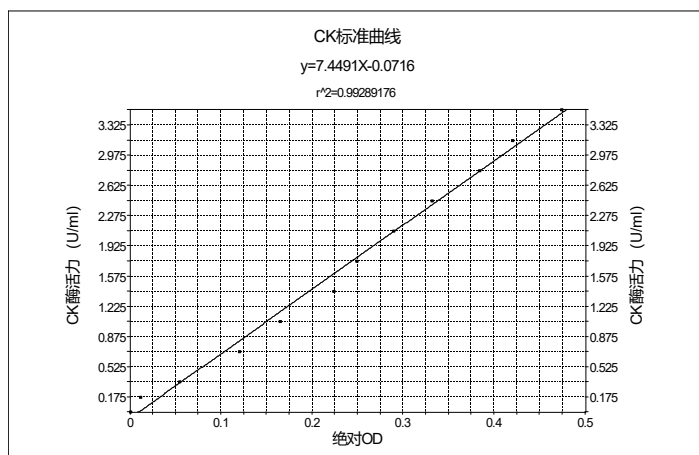
### 2、简化测定操作表：

	测定管	对照管
CK 标准品 (μL)	20	
混合试剂 (μL) (37°C 预温)	300	300
旋涡混匀, 37°C 水浴 20 分钟		
试剂六 (μL)	100	100
CK 标准品 (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
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