

肌酸激酶（CK）测定试剂盒说明书

（货号:A032-1-1 比色法 50 管/24 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

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，-20℃或者 4℃保存。
- 试剂二：**液体 1.5mL×1 瓶，-20℃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，离心 2 分钟后使用）
- 试剂四：**粉剂×1 支，临用前一支粉剂加双蒸水 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，-20℃保存，临用时每支加双蒸水 2mL。配好后-20℃以下可保存 5 天，避免反复冻融。
- 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，临用时每瓶加双蒸水 20mL，溶解后即**为试剂八应用液** 4℃保存，颜色变深后弃用。
- 试剂九：**液体 50mL×1 瓶，室温保存。
- 附送双蒸水 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：试剂九=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，定磷剂需用现配；建议先配制少量定磷剂来看是否存在以上异常现象，一切正常后再按需要量进行配制；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℃及 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 10⁶ 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℃ 水浴 20 分钟		
试剂六（μL）	100	100
待测样本（μL）		20
旋涡混匀，离心 3500rpm×10min，取上清定磷		
上清（μL）	300	300
定磷剂（μL）	2000	2000
混匀，45℃水浴 15 分钟，双蒸水调零，波长 660nm，光径 1cm，分光光度计测定各管吸光度值 A。		

[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（浆）等液体样本计算公式：

CK活力 根据标曲计算获得的

$$(U/mL) = \frac{CK酶活力 (U/mL)}{N} \times N$$
$$= \frac{[7.4491 \times (A_{测定} - A_{对照}) - 0.0716]}{N} \times N$$

N：样本测试前稀释倍数；

②、组织或细胞样本计算公式：

CK活力 根据标曲计算获得的

$$(U/mg \text{ 蛋白}) = \frac{CK酶活力 (U/mL)}{Cpr} \times N \div Cpr$$
$$= \frac{[7.4491 \times (A_{测定} - A_{对照}) - 0.0716]}{Cpr} \times N$$

以上公式中：

N 为样本测试前稀释倍数；

Cpr 为组织样本匀浆上清蛋白浓度，mg/mL。

（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，可以直接代入给定公式，但一定要注意，测定所得吸光度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）

五、注意事项：

- 所有样品均要检测测定管及对照管。
- 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。
- 血清 4℃存放不可超过 10 小时，冷冻可延长存放时间。
- 此法为微量，灵敏，快速法。所以对测定耗材要求严格，不能含磷。**最好用一次性塑料管或者离心管**，这样可以避免磷污染。这一点很重要，也是实验成败的关键因素。
- 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。
- 大批量样本操作时，最好采用简化操作法，这样快捷、准确。
- 所有配试剂的器皿要专用，或者用新的（包括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。若酶活太高（处于酶活力曲线的平坦部分），则易检测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），则易检测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。

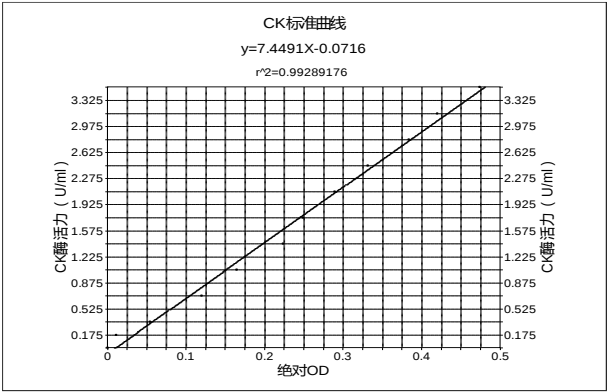
这样做对科研结果分析及 t 检验有很大帮助。

附录 I :CK 标准曲线的制备（参考）

- 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℃ 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℃ 预温）	300	300
旋涡混匀，37℃ 水浴 20 分钟		
试剂六（μL）	100	100
CK 标准品（μL）		20
旋涡混匀，离心 3500rpm×10min，取上清定磷		
上清（μL）	300	300
定磷剂（μL）	2000	2000
旋涡混匀，45℃ 水浴 15 分钟，双蒸水调零，波长 660nm，光径 1cm，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。