

肌酸含量检测试剂盒微量法

中文名称：**肌酸含量检测试剂盒**

英文名称：Creatine Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：2-8°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×1 支	2-8°C保存
试剂一稀释液	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入 0.33mL 乙醇溶解，-20°C可以保存 2 周，试剂若变为深棕色则不可再使用；
2. 试剂一工作液：临用前根据样本量按试剂一：试剂一稀释液=40 μ L：560 μ L（共 600 μ L，约 15T）的比例进行配制，现配现用，当天用完；
3. 标准品：1mg 一水肌酸。临用前加入 1mL 蒸馏水，充分溶解，即 1mg/mL 一水肌酸标准储备液。用不完的试剂 4°C保存一个月。

产品说明:

肌酸(Creatine)是一种含氮化合物, 自然存在于脊椎动物体内, 能够辅助为肌肉和神经细胞提供能量。肌酸可由精氨酸(arginine)、甘氨酸(glycine)及甲硫氨酸(methionine)三种氨基酸合成, 可由人体自行合成, 也可以从食物中摄取。大约 95%的肌酸存在于骨骼肌中, 主要存在形式为磷酸肌酸。肌酸作为一种补充剂主要通过增加肌肉质量, 增强运动表现能力。肌酸也被作为神经肌肉疾病的一种治疗药被广泛研究, 它可能有助于保护神经和改善细胞生物功能状态。

肌酸可在碱性条件下与联乙酰- α -萘酚发生反应, 生成红色产物在 530nm 处有吸收峰。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理(可适当调整待测样本量)**

1. 组织: 按照质量(g): 提取液一体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液一)加入提取液一, 冰浴匀浆后于 4°C, 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 4°C 12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞: 按照细胞数量(10^6 个): 提取液一体积(mL)为 5~10: 1 的比例(建议 5×10^6 个细胞加入 1mL 提取液一), 冰浴超声波破碎细胞(功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 于 4°C, 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二,

缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C12000g 离心 10min 后取上清待测。血清(浆)等液体：取 100μL 液体加入 1mL 提取液一，4°C12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再缓慢加入 0.15mL 提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，12000g 离心 10min 后取上清待测。

注：提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用 2mLEP 管进行操作。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液配制：将 1mg/mL 一水肌酸标准储备液，用蒸馏水稀释至 200、160、130、100、50、25、12.5μg/mL 标准溶液待用。
- 3、按下表步骤加样：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	20	20	-	-
蒸馏水	-	20	20	-
标准溶液	-	-	-	20
试剂一工作液	40	40	40	40
试剂二	20	-	20	20
室温避光反应 10min				
蒸馏水	120	120	120	120
充分混匀，于 530nm 处测定吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准曲线只需进行 1-2 次。				

注：空白管只需做 1-2 次。

三、肌酸含量计算

- 1、标准曲线绘制：以肌酸标准溶液浓度为横坐标(x, μg/mL)，以 ΔA 标准为纵坐标(y)绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入方程求得 x(μg/mL)。

2、计算公式

(1) 按照蛋白浓度计算

肌酸含量($\mu\text{g}/\text{mgprot}$)= $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 0.879 = x \div \text{Cpr} \times 0.879$

(2) 按照样本质量计算

肌酸含量($\mu\text{g}/\text{g}$ 质量)= $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 = 1.044 \times x \div W$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

肌酸含量($\mu\text{g}/10^4\text{cell}$)= $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879$
 $= 1.044 \times x \div \text{细胞数量}$

(4) 按照血清(浆)体积计算

肌酸含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)= $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times 0.879 = 11.482 \times x$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; $V_{\text{上清}}$: 提取液一提取时上清液体积, 0.8mL ; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; 细胞或细菌数量, 以 10^4 计; $V_{\text{提取液一}}$: 加入提取液一体积, 1mL ; $V_{\text{提取液二}}$: 加入提取液二体积, 0.15mL ; $V_{\text{液体}}$: 液体样本体积, 0.1mL ; 0.879 : 换算系数, 一水肌酸相对分子质量 149.15 , 无水肌酸相对分子质量 131.13 , $0.879 = 131.13 \div 149.15$ 。

注意事项:

- 1、显色完成后, 请在 10min 之内完成检测。
- 2、提取液中含有蛋白沉淀剂, 提取的上清液不能用于蛋白浓度的测定。若想要用蛋白浓度计算肌酸含量需要另取样本, 即取相同质量的组织、同等数目的细菌或细胞, 用 1.1875mLPBS (生理盐水) 匀浆; 取相同体积的血清(浆), 用 1.206mLPBS (生理盐水) 匀浆(相当于提取步骤最终样本上清液), 用 BCA 法进行蛋白浓度测定。
- 3、如果测定吸光值低于或超过标准溶液线性范围的吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本

后再进行测定。

4、试剂一、试剂二对人体有刺激性，请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。

实验实例：

1、取 0.1g 兔肾脏加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨离心，取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测定后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.128-0.064=0.064，带入标准曲线 $y=0.0062x-0.0143$ ，计算 $x=12.629$ 。按样本质量计算含量得：肌酸含量($\mu\text{g/g}$ 质量)= $1.044 \times x \div W=131.85\mu\text{g/g}$ 质量。

2、取 100 μL 牛血清加入 1mL 提取液一，离心取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清，之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测定后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.271-0.07=0.201，带入标准曲线 $y=0.0062x-0.0143$ ，计算 $x=34.726$ 。按照液体体积计算含量得：肌酸含量($\mu\text{g/mL}$)= $11.482 \times x=398.7\mu\text{g/mL}$ 。

mlbio
Good elisakit producers