

## 肌酸含量检测试剂盒(酶法)

中文名称：肌酸含量检测试剂盒(酶法)

英文名称：Creatine Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20°C

检测方法：可见分光光度法

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 30mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 5mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂四 A 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四 B 液	液体 15mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

**试剂一：**临用前每支加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存。

**试剂二：**临用前每支加入 0.2 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存。

**试剂三：**临用前每支加入 0.5 mL 蒸馏水(100T/48S)，充分溶解。为方便储存故多给一支。

用不完的试剂分装后-20°C保存。

**试剂四：**临用前根据试验所需用量，按照试剂四 A 液：试剂四 B 液=1:1，充分混匀，现用现配。

**标准品：**1 mg 一水肌酸。临用前加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，即 1mg/mL 一水肌酸标准储备液。临用前取 20 $\mu$ L 和 80 $\mu$ L 蒸馏水混合配制成 200 $\mu$ g/mL 作为标准溶液待测。现用现配。

#### **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。

肌酸酶偶联肌氨酸氧化酶，可将肌酸转化为甘氨酸、甲醛、过氧化氢，过氧化物酶催化过氧化氢氧化 4-氨基安替比林偶联酚，生成有色化合物，在 505nm 有特征吸收峰。

**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、低温离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、超声破碎仪。

#### **操作步骤：**

##### **一、样本处理(可适当调整待测样本量)**

1、细菌、细胞样本的制备：按照细胞数量( $10^4$ 个):提取液一体积(mL)为 500~1000:1 的比

例(建议 500 万细胞加入 1mL 提取液一), 冰浴超声波破碎细胞(功率 300W, 超声 3 秒, 间隔 9 秒, 总时间 5min); 于 4°C, 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再加入 0.15mL 提取液二, 4°C, 12000g 离心 10min 后取上清待测。

2、组织样本的制备: 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 组织, 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, 再加入 0.15mL 提取液二, 4°C, 12000g 离心 10min 后取上清待测。

3、血清(浆): 取 100 $\mu$ L 血清(浆)加入 1mL 提取液一, 4°C, 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再加入 0.15mL 提取液二, 4°C, 12000g 离心 10min 后取上清待测。

## 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 505nm, 蒸馏水调零。

2、按下表步骤加样:

试剂名称( $\mu$ L)	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	50	50	-	-
蒸馏水	-	50	50	-
标准溶液	-	-	-	50
试剂一	50	-	50	50
充分混匀, 37°C(哺乳动物)或 25°C(其他物种)条件下, 反应 10 min。				
试剂二	5	5	5	5
试剂三	5	5	5	5
试剂四	400	400	400	400
充分混匀, 37°C(哺乳动物)或 25°C(其他物种)条件下, 显色 30min。				
蒸馏水	500	500	500	500
充分混匀, 测定 505nm 处的吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 对照, $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。				

注: 空白管只需做 1-2 次。

## 三、肌酸含量计算

## 1、计算公式

## (1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{mgprot}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 0.879 = 175.8 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{pr}}$$

## (2) 按照样本质量计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{g 质量}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 = 208.76 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W$$

## (3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 = 208.76 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{细胞数量}$$

## (4) 按照血清(浆)体积计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times 0.879 = 2296.39 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}$$

C 标：标准管浓度，200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；V 样：加入样本体积，50 $\mu\text{L}$ =0.05mL；V 上清：提取时上清液体积，0.8mL；V 提取液一：加入提取液一体积，1mL；V 提取液二：加入提取液二体积，0.15mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细胞数量：以 10<sup>4</sup> 计；V 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酐含量需要另取组织或血清(浆)，即取相同质量(体积)的组织(血清(浆))用

1.1875mLPBS(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、如果测定吸光值超过标准管吸光值, 建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定。如果测定吸光值过小, 建议增大样本量后再进行测定。

#### 实验实例:

1、取 0.1g 大鼠肌肉加入 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, 测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.752 - 0.012 = 0.74$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.672 - 0.014 = 0.66$ 。按样本质量计算含量得: 肌酸含量( $\mu\text{g/g}$  质量) =  $208.76 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 2340 \mu\text{g/g}$  质量。

2、取 100 $\mu\text{L}$  牛血清加入 1mL 提取液一, 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, 测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.061 - 0.016 = 0.045$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.672 - 0.014 = 0.66$ 。按照液体体积计算含量得: 肌酸含量( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $2296.39 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 156.57 \mu\text{g/mL}$  血清。