

肌酐含量(肌氨酸氧化酶法)试剂盒 48 样

编号: ml300870

微量法 50 管/48 样

注 意: 正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

肌酐(Creatinine, CRE)是肌肉代谢的产物, 主要通过肾小球滤过排出体外。在正常情况下, 体内肌酐的含量基本稳定。血液中的肌酐浓度可作为检测肾小球滤过功能的指标之一。

测定原理:

肌酐酶特异作用于肌酐生成肌酸, 肌酸在肌酸酶和肌氨酸氧化酶的相继作用下生成过氧化氢, 过氧化氢与显色剂反应呈现紫色, 该有色物质在 546nm 有最大吸收峰, 进而计算得到肌酐含量。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 10mL×1 瓶, -20°C避光保存;

试剂二: 3.5mL×1 瓶, -20°C避光保存;

标准品: 粉剂 x1 瓶, 4°C避光保存, 用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水溶解即标准品浓度为 2mg/mL, 再用蒸馏水稀释 40 倍(1:39 份水)成 0.05mg/mL, 即 442 μ mol/L 的肌酐标准品待测液;

样品提取:

1、**组织的处理:** 按照组织质量 (g): 生理盐水或常用 PBS 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水), 冰浴匀浆, 转移到离心管中, 离心 10min (12000rpm, 25°C), 取上清供测定用。

2、**液体样本处理:** 按澄清的液体可直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测;

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 设置温度再 37°C, 调节波长至 546nm。

2、在 EP 管中加入下列试剂:

试剂 (μL)	测定管	空白管(只做一管)	标准管(只做一管)
样本	6		
蒸馏水		6	
标准品			6
试剂一	180	180	180
混匀, 37°C 孵育 5min 后于 546nm 处读取吸光值 A1			
试剂二	60	60	60
混匀, 37°C 孵育 15min 后于 546nm 处读取吸光值 A2 $\Delta A = A2 - A1$			

注意:

1. 如果 ΔA 大于 0.8, 需要将样本用蒸馏水稀释, 计算公式中乘以相应稀释倍数。
2. 如果 ΔA 的值小于 0.01, 可增加样本加样体积 V1 (如由 6μL 增至 20μL, 则试剂二相应减少, 空白管和标准管变化同测定管), 或增加样本取样质量 W; 则改变后的 V1 和 W 需带入公式重新计算。

结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\begin{aligned}\text{肌酐含量}(\text{nmol/g}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \\ &= 442 \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}\end{aligned}$$

2、按液体体积计算:

$$\begin{aligned}\text{肌酐含量}(\mu\text{mol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 442 \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \times \text{D}\end{aligned}$$

V: 加入提取液体积, 1 mL;

D: 稀释倍数, 未稀释为 1;

V1: 加入样本体积, 0.006mL;

W: 样本质量, g;

V2: 加入标准品体积, 0.006mL;

C 标准: 肌酐标准品, 0.05mg/mL=442μmol/L=442nmol/mL;

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。