

肌酸含量(肌氨酸氧化酶法)试剂盒 48 样

编号: ml300872

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。肌酸补充剂是一种运动性能增强剂, 也用于治疗肌肉和神经退行性疾病, 因此肌酸的检测在研究和开发中具有广泛的应用。

测定原理:

肌酸在肌酸酶的作用下生成肌氨酸, 肌氨酸在肌氨酸氧化酶的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:

提取液 A: 60mLx1 瓶, 4°C避光保存;

提取液 B: 30mLx1 瓶, 4°C保存;

试剂一: 10mLx1 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 蒸馏水充分溶解即标准品浓度为 1mg/mL, 再用蒸馏水稀释 40 倍(1:39 份水)成 0.025mg/mL, 即 190.65 μ mol/L 的肌酸标准品待测液;

(提取液 A 和提取液 B 有腐蚀性, 操作时注意佩戴手套)

样品提取：

一、组织样本的处理：

- 1、按照质量(g)：提取液 A 体积(mL)为 1：5~10 的比例加入提取液，冰浴匀浆；
(建议先尝试 0.2g：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 12,000×g 离心力 10℃ 离心 10min，取上清液；
(动物样本可能会有飘浮在上层的脂肪，注意不要吸取到)
- 3、取 300μL 上清液，滴加提取液 B 300μL；
(加入后会有白色沉淀产生为正常现象；)
- 4、然后 12,000g 离心力 10℃ 离心 5min，取上清液待测 (记为样本待测液)；

二、液体样本处理：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	10		
蒸馏水		10	
标准品			10
试剂一	190	190	190
混匀, 546nm 处测定吸光值 A1 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 1, 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 10μL 增至 20μL 或更多, 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:

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量}(\text{nmol/g}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \\ &= 381.3 \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}\end{aligned}$$

2、按液体体积计算:

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量}(\text{umol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 190.65 \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \times \text{D}\end{aligned}$$

V: 加入提取液体积, 2 mL;

D: 稀释倍数, 未稀释为 1;

V1: 加入样本体积, 0.01mL;

W: 样本质量, g;

V2: 加入标准品体积, 0.01mL;

C 标准: 肌酸标准品, $0.025\text{mg/mL} = 190.65\mu\text{mol/L} = 190.65\text{nmol/mL}$;

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。