

肌酐（Cr）含量检测试剂盒说明书（肌氨酸氧化酶法）

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4915

规格：100T/96S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四	液体 0.6 mL×1 支	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂六 A 液	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六 B 液	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

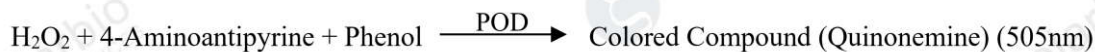
1. 试剂一：临用前加入 2.2 mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
2. 试剂二：临用前加入 2.2mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
3. 试剂三：临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
4. 试剂三工作液：根据实验所需用量，按照试剂三：蒸馏水=1:9 的比例，充分混匀，现配现用。
5. 试剂五：临用前加入 4.4 mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
6. 试剂六：临用前根据实验所需用量，按照试剂六 A 液：试剂六 B 液=1:1 的比例，充分混匀，现用现配
7. 标准品：10 mg 肌酐。临用前加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，即 10 mg/mL 标准品，2-8℃保存 4 周。
8. 200μg/mL 标准品：临用前取 20μL 10mg/mL 标准品和 980μL 蒸馏水混合配制成 200μg/mL 的标准品用于下述实验，现用现配。

产品说明：

肌酐（creatinine, Cr），化学式是 $C_4H_7N_3O$ ，是肌肉在人体内代谢的产物，主要由肾小球滤过排出体外。血中肌酐来自外源性和内源性两种，外源性肌酐是肉类食物在体内代谢后的产物；内源性肌酐是体内肌肉组织代谢的产物。

样品中的肌酐在肌酐酶的催化下水解生成肌酸。在肌酸酶的催化下肌酸水解生成肌氨酸和尿素。肌氨酸在肌氨酸氧化酶的催化下氧化产生过氧化氢。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。

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/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照质量（g）：提取液一（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℃，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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液一（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 5 min）；于 4℃，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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取 100μL 液体加入 1mL 提取液一，4℃ 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，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 2mL EP 管进行操作。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 505 nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	空白管	标准管
样本	20	-	-
蒸馏水	-	20	-
标准品	-	-	20
试剂一	20	20	20
试剂二	20	20	20
试剂三工作液	5	5	5
试剂四	5	5	5
充分混匀，37℃反应 10 min。			
试剂五	40	40	40
试剂六	90	90	90

充分混匀，37℃显色 30 min。测定 505 nm 处的吸光度。分别记为 A 测定、A 空白、A 标准。计算 ΔA 测 = A 测定 - A 空白，ΔA 标 = A 标准 - A 空白。标准管和空白管只需测定 1-2 次。

若样本量过多，也可将试剂一、试剂二、试剂三工作液、试剂四（根据加样比例）配制成工作液 I、试剂五和试剂六（根据加样比例）配制成工作液 II 使用。



三、肌酐含量计算

1、计算公式

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times F = 200 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) &= C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F \\ &= 237.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \times F \end{aligned}$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F \\ &= 237.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div N \times F \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times F \\ &= 2612.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times F \end{aligned}$$

C 标：标准管浓度，200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；V 样：加入样本体积，20 μL =0.02mL；V 上清：提取时上清液体积，0.8 mL；V 提取液一：加入提取液一体积，1 mL；V 提取液二：加入提取液二体积，0.15 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；N：细胞数量，以 10^4 计；V 液体：液体样本体积，0.1 mL；F：样本稀释倍数。

注意事项：

1、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样本，即取相同质量的组织、同等数目或细胞，用 1.1875mLPBS（生理盐水）匀浆；取相同体积的液体，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。

2、如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 0.7，建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.01，建议增大样本量后再进行测定。

3、尽量在 10min 内完成显色。

实验实例：

1、取 0.1036g 兔肌肉加入 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，用 96 孔板测定后测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.181 - 0.078 = 0.103$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.716 - 0.078 = 0.638$ 。按样本质量计算含量得：

$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) = 237.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W = 370.10 \mu\text{g}/\text{g 质量}。$$

相关发表文献：

- [1] Pan L, Yu H, Fu J, Hu J, Xu H, Zhang Z, Bu M, Yang X, Zhang H, Lu J, Jiang J, Wang Y. Berberine ameliorates chronic kidney disease through inhibiting the production of gut-derived uremic toxins in the gut microbiota. Acta Pharm Sin B. 2023 Apr;13(4):1537-1553. doi: 10.1016/j.apsb.2022.12.010. Epub 2022 Dec 20. PMID: 37139409; PMCID: PMC10149897.
- [2] Yu Z, Xu L, He K, Lu M, Yan R, Song X, Li X. Actin depolymerizing factor-based nanomaterials: A novel strategy to enhance E. mitis-specific immunity. Front Immunol. 2022 Dec 21;13:1080630. doi: 10.3389/fimmu.2022.1080630. PMID: 36618362; PMCID: PMC9810622.





- [3] Xu L, Yu Z, He K, Wen Z, Aleem MT, Yan R, Song X, Lu M, Li X. PLGA Nanospheres as Delivery Platforms for *Eimeria mitis* 1a Protein: A Novel Strategy to Improve Specific Immunity. *Front Immunol*. 2022 May 26;13:901758. doi: 10.3389/fimmu.2022.901758. PMID: 35693811; PMCID: PMC9178187.
- [4] Liang Y, Wang PY, Li YJ, Liu ZY, Wang RR, Sun GB, Sun HF, Xie SY. Multistage O₂-producing liposome for MRI-guided synergistic chemodynamic/chemotherapy to reverse cancer multidrug resistance. *Int J Pharm*. 2023 Jan 25;631:122488. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122488. Epub 2022 Dec 13. PMID: 36521638.
- [5] Xu G, Li W, Zhao Y, Fan T, Gao Q, Wang Y, Zhang F, Gao M, An Z, Yang Z. Overexpression of Lias Gene Alleviates Cadmium-Induced Kidney Injury in Mice Involving Multiple Effects: Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation. *Biol Trace Elem Res*. 2023 Oct 7. doi: 10.1007/s12011-023-03883-x. Epub ahead of print. PMID: 37804446.
- [6] Liu HB, Yang M, Li W, Luo T, Wu Y, Huang XY, Zhang YL, Liu T, Luo Y. Dispelling Dampness, Relieving Turbidity and Dredging Collaterals Decoction, Attenuates Potassium Oxonate-Induced Hyperuricemia in Rat Models. *Drug Des Devel Ther*. 2023 Aug 2;17:2287-2301. doi: 10.2147/DDDT.S419130. PMID: 37551408; PMCID: PMC10404409.

