

肌酸含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC4920

规格：50T/24S

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 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂一稀释液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	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 1mL 乙醇溶解，-20℃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=40μL：560μL（共 600μL，约 3T）的比例进行配制，现配现用，当天用完。
3. 标准品：1 mg 一水肌酸。临用前加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，即 1 mg/mL 一水肌酸标准储备液。用不完的试剂 2-8℃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 530 nm 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、低温离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、乙醇(>98%，AR)、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℃，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。



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、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 530 nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液配制：将 1 mg/mL 一水肌酸标准储备液，用蒸馏水稀释至 100、80、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液待用。（备注：注意不要在此步骤直接检测吸光值）
- 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	100	100	-	-
蒸馏水	-	100	100	-
标准溶液	-	-	-	100
试剂一工作液	200	200	200	200
试剂二	100	-	100	100
室温避光反应 10 min				
蒸馏水	600	600	600	600

充分混匀，测定 530 nm 处的吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准曲线只需进行 1-2 次。

三、肌酸含量计算

- 1、标准曲线绘制：以一水肌酸标准溶液浓度为横坐标（x， $\mu\text{g/mL}$ ），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（ $\mu\text{g/mL}$ ）。
- 2、计算公式

- (1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{肌酸含量 (}\mu\text{g/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 0.879 = x \div C_{\text{pr}} \times 0.879$$

- ### (2) 按照样本质量计算

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

- ### (3) 按照细菌或细胞数量计算

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

- #### (4) 按照血清(浆)体积计算

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

V 样: 加入样本体积, $100\ \mu\text{L}=0.1\ \text{mL}$; V 上清: 提取液一提取时上清液体积, $0.8\ \text{mL}$; 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 提取液一: 加入提取液一体积, $1\ \text{mL}$; V 提取液二:



加入提取液二体积, 0.15 mL; V 液体: 液体样本体积, 0.1 mL; 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, $0.879=131.13\div149.15$ 。

注意事项:

- 1、显色完成后, 请在 10 min 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线性范围吸光值, 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 小鼠肌肉加入 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, 离心取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=1.335-0.058=1.277, 带入标准曲线 $y=0.0118x+0.0343$, 计算 $x=105.3$ 。按样本质量计算含量得:
肌酸含量 ($\mu\text{g/g}$ 质量) = $1.044 \times x \div W \times 2$ (稀释倍数) = $2198.7 \mu\text{g/g}$ 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, 测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.596-0.069=0.527, 带入标准曲线 $y=0.0118x+0.0343$, 计算 $x=41.754$ 。按照液体体积计算含量得:
肌酸含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $11.482 \times x = 479.4 \mu\text{g/mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Zhang J, Chen L, Zhang L, Chen Q, Tan F, Zhao X. Effect of *Lactobacillus fermentum* HFY03 on the Antifatigue and Antioxidation Ability of Running Exhausted Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Sep 28;2021:8013681. doi: 10.1155/2021/8013681. PMID: 34621465; PMCID: PMC8492249.

