

肌酸含量检测试剂盒说明书

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：BC4925

规格：100T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 10 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 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 2 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 0.33mL 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 15T）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/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、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（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 (10^6 个): 提取液一体积 (mL) 为5~10: 1的比例 (建议 5×10^6 个细胞加入1mL提取液一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率300w, 超声3秒, 间隔7秒, 总时间3min); 于4°C, 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°C 12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清(浆)等液体: 取100 μ L液体加入1mL提取液一, 4°C 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 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 200、160、130、100、50、25、12.5 μ 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 (μ L)	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	20	20	-	-
蒸馏水	-	20	20	-
标准溶液	-	-	-	20
试剂一工作液	40	40	40	40
试剂二	20	-	20	20
室温避光反应 10 min				
蒸馏水	120	120	120	120
充分混匀, 于 530 nm 处测定吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 ΔA 测定=A 测定-A 对照, ΔA 标准=A 标准-A 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: 以肌酸标准溶液浓度为横坐标 (x, μ 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 (μ 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

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

V 样: 加入样本体积, 20 μ L=0.02 mL; V 上清: 提取液一提取时上清液体积, 0.8 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 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标准溶液线性范围的吸光值, 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 兔肾脏加入 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 孔板测定后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.128-0.064=0.064, 带入标准曲线 $y=0.0062x-0.0143$, 计算 $x=12.629$ 。按样本质量计算含量得:
肌酸含量 ($\mu\text{g/g}$ 质量) $=1.044\times x\div W=131.85 \mu\text{g/g}$ 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, 用 96 孔板测定后计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.271-0.07=0.201, 带入标准曲线 $y=0.0062x-0.0143$, 计算 $x=34.726$ 。按照液体体积计算含量得:
肌酸含量 ($\mu\text{g/mL}$) $=11.482\times x=398.7 \mu\text{g/mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Cui Y, Yu M, Li Z, Song M, Tian Z, Deng D, Ma X. Guanidine Acetic Acid Alters Tissue Bound Amino Acid Profiles and Oxidative Status in Finishing Pigs. *Animals (Basel)*. 2023 May 12;13(10):1626. doi: 10.3390/ani13101626. PMID: 37238056; PMCID: PMC10215443.
- [2] 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.

