

肌酸含量检测试剂盒（酶法）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：BC4935

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 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	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四 A 液	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四 B 液	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

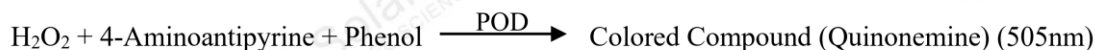
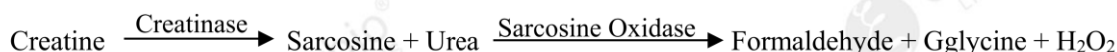
溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入 2.4 mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融。
2. 试剂二：临用前加入 0.25 mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融。
3. 试剂三：临用前加入 0.5 mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融。
4. 试剂四：临用前根据试验所需用量，按照试剂四 A 液：试剂四 B 液=1:1，充分混匀，现用现配。
5. 标准品：10 mg 一水肌酸。临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解，即 10 mg/mL 一水肌酸标准品，2-8℃保存 4 周。
6. 200μg/mL 标准品：临用前取 20μL 200μg/mL 标准品和 980μL 蒸馏水混合配制成 200μg/mL 作为标准品用于下述实验。现用现配。

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。

肌酸酶偶联肌氨酸氧化酶，可将肌酸转化为甘氨酸、甲醛、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、水浴锅、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5min）；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：（在 EP 管或 96 孔板中加入下述试剂）

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
充分混匀，37℃反应 10 min。			
试剂二	2	2	2
试剂三	2	2	2
试剂四	160	160	160
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。空白管和标准管只需做 1-2 次。 若样本量过多，也可将试剂二、试剂三、试剂四（根据加样比例）配制成工作液使用。			

三、肌酸含量计算

1、计算公式

（1）按照蛋白浓度计算

$$\text{肌酸含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = C_{\text{标}} \times V_{\text{样}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 0.879 \times F = 175.8 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{pr}} \times 0.879 \times F$$

（2）按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) &= C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 \times F \\ &= 208.76 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \times F \end{aligned}$$



(3) 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/10^4\text{ cells}) &= \text{C 标} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (\text{V}_{\text{上清}} + \text{V}_{\text{提取液一}}) \div (\text{N} \times \text{V}_{\text{上清}} \div \text{V}_{\text{提取液一}}) \times 0.879 \times F \\ &= 208.76 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{N} \times F\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) &= \text{C 标} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (\text{V}_{\text{上清}} + \text{V}_{\text{提取液二}}) \div [\text{V}_{\text{液体}} \times \text{V}_{\text{上清}} \div (\text{V}_{\text{提取液一}} + \text{V}_{\text{液体}})] \times 0.879 \times F \\ &= 2296.39 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times F\end{aligned}$$

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; 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, $0.879=131.13 \div 149.15$ 。

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。
- 3、如果 $\Delta A_{\text{测}} > 1$, 建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定。如果 $\Delta A_{\text{测}} < 0.01$, 建议增大样本量后再进行测定。

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, 离心后取上清稀释 4 倍按照测定步骤操作, 96 孔板测定并计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.325 - 0.043 = 0.282$, $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.695 - 0.053 = 0.642$ 。按样本质量计算含量得:
肌酸含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 质量) $= 208.76 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \times 4 = 3540.48 \mu\text{g}/\text{g}$ 质量。
- 2、取 0.1010g 大鼠肌肉加入 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, 离心后取上清稀释 2 倍按照测定步骤操作, 96 孔板测定并计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.438 - 0.042 = 0.396$, $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.695 - 0.053 = 0.642$ 。按样本质量计算含量得:
肌酸含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 质量) $= 208.76 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \times 2 = 2549.86 \mu\text{g}/\text{g}$ 质量。

