



## 肌酸含量检测试剂盒(酶法)

中文名称：[肌酸含量检测试剂盒\(酶法\)](#)

英文名称：Creatine Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂四 A 液	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四 B 液	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

**试剂一：**临用前每支加入 550 $\mu$ L 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存。

**试剂二：**临用前每支加入 0.15mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存。

**试剂三：**临用前每支加入 0.5mL 蒸馏水(100T/48S)，充分溶解。为方便储存故多给一支。



用不完的试剂分装后-20℃保存。

**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。

**标准品:** 1mg 一水肌酸。临用前加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解, 即 1mg/mL 一水肌酸标准储备液。临用前取 20 $\mu$ L 和 80 $\mu$ L 蒸馏水混合配制成 200 $\mu$ g/mL 作为标准溶液待测。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。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、冰和蒸馏水、超声破碎仪。

#### 操作步骤:

##### 一、样本处理(可适当调整待测样本量)



1、细菌、细胞样本的制备：按照细胞数量( $10^4$  个):提取液一:体积(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°C,12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再加入 0.15mL 提取液二，4°C,12000g 离心 10min 后取上清待测。

2、组织样本的制备：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 组织,加入 1mL 提取液一)加入提取液一,冰浴匀浆后于 4°C,12000g 离心 10min,取 0.8mL 上清液，再加入 0.15mL 提取液二，4°C,12000g 离心 10min 后取上清待测。

3、血清(浆)：取 100 $\mu$ L 血清(浆)加入 1mL 提取液一，4°C12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再加入 0.15mL 提取液二，4°C,12000g 离心 10min 后取上清待测。

## 二、测定步骤

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

2、按下表步骤加样：

试剂名称( $\mu$ 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	20	-	20	20
充分混匀，37°C(哺乳动物)或 25°C(其他物种)条件下，反应 10 min。				
试剂二	2	2	2	2
试剂三	2	2	2	2
试剂四	160	160	160	160
充分混匀，37°C(哺乳动物)或 25°C(其他物种)条件下，显色 30min。测定 505nm 处的吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。				

**注：**空白管只需做 1-2 次。

### 注意事项：

1、显色完成后，请在 10min 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组织或血清(浆)，即取相同质量(体积)的组织(血清(浆))用 1.1875mL PBS(生理盐水)匀浆(相当于提取步骤样本上清液)，用 BCA 法进行蛋白浓度测定。
- 3、如果测定吸光值超过标准管吸光值，建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定。如果测定吸光值过小，建议增大样本量后再进行测定。

#### 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 孔板测得数据后计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.108 - 0.074 = 0.034$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.806 - 0.053 = 0.753$ 。按样本质量计算含量得：肌酸含量( $\mu\text{g/g}$  质量) =  $208.76 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 94.26 \mu\text{g/g}$  质量。
- 2、取 100 $\mu\text{L}$  牛血清加入 1mL 提取液一，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 孔板测得数据后计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.122 - 0.062 = 0.06$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.806 - 0.053 = 0.753$ 。按照液体体积计算含量得：肌酸含量( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $2296.39 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 282.98 \mu\text{g/mL}$  血清。