

肌酸含量（酶法）检测试剂盒说明书

(货号:BP10137F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

肌酸是一种内源性化合物,其功能是通过肌酸激酶的磷酸化使机体维持高的 ATP/ADP 比率。肌酸补充剂是一种运动性能增强剂,亦用于治疗肌肉和神经退行性疾病。因此肌酸的检测在研究和开发中具有广泛的应用。

本试剂盒利用肌酸酶特异作用于肌酸生成肌氨酸,肌氨酸在肌氨酸氧化酶的作用下生成过氧化氢,过氧化氢与显色剂反应呈现(粉)红色,该有色物质在 520nm 有最大吸收峰,进而计算得到肌酸含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底; 2. 加 1.1ml 蒸馏水,溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉体 1 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底; 2. 加 1.1ml 蒸馏水,溶解备用; 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准管	液体 1mL×1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底; 2. 用蒸馏水稀释 5 倍,取 100μl 标准品母液加 400μl 蒸馏水,即 0.2mg/mL 肌酸标准品溶液 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织样本,加 1mL 的提取液研磨,粗提液全部转移到 EP 管中,12000rpm,常温离心 10min,上清液待测。

② 液体样品:澄清的液体可直接检测;若浑浊则离心后取上清液检测。

③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 打开分光光度计，设置温度 37℃（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节波长到 520nm，蒸馏水调零。

② 做实验前选取 2 个样本，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。

③ 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	40		
蒸馏水		40	
标准品			40
试剂一	420	420	420
试剂二	300	300	300
试剂三	20	20	20
混匀，37℃避光孵育 10min。			
试剂四	20	20	20
混匀，37℃避光反应 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 处读取吸光值 A（直到 A 值不变）， △A=A 测定-A 空白。			

【注】：1. 测定管的 A 值若超过 1，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若△A 的值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 40μL 增至 100μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量 W；则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若样本自身含有高的肌氨酸含量，需增设一个样本自身对照：

（即 40μL 样本+440μL 试剂一+300μL 试剂二+20μL 试剂三），△A=A 测定-A 对照。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量}(\mu\text{mol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \div V \times W) \times D \times 10^3 \div Mr \\ &= 1.53 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div W\end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \div V \times Cpr) \times D \times 10^3 \div Mr \\ &= 1.53 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div Cpr\end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{mol/L}) = (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \times 10^6 \div Mr$$

$$=1525.2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

4、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times 500) \times D \times 10^6 \div Mr \\ &= 3.05 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，0.2mg/mL；

Mr---标准品分子量，131.13；

V---提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

500---细胞数量，百万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。