

# 肌酸含量检测试剂盒

**中文名称** : 肌酸含量检测试剂盒

**英文名称** : Creatine Content Assay Kit

**产品包装** : 盒装

**产品规格** : 100T/48S

**储存条件** : 2-8°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×1 支	2-8°C保存
试剂一稀释液	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 2 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:**

1. 试剂一: 临用前加入 0.33mL 乙醇溶解, -20°C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: 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。用不完的试剂 4°C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- $\alpha$ -萘酚发生反应，生成红色产物在 530nm 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、冰和蒸馏水。

**操作步骤：****一、样本处理(可适当调整待测样本量)**

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°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°C12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞：按照细胞数量(10<sup>6</sup> 个): 提取液一体积(mL)为 5~10: 1 的比例(建议 5×10<sup>6</sup> 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°C12000g 离心 10min 后取上清待测。血清(浆)等液体：取 100μL 液体加入 1mL 提取液一，4°C12000g 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 2mLEP 管进行操作。

## 二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液配制：将 1mg/mL 一水肌酸标准储备液，用蒸馏水稀释至 200、160、130、100、50、25、12.5μg/mL 标准溶液待用。
- 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	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 10min				
蒸馏水	120	120	120	120

充分混匀，于 530nm 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。

**注：**空白管只需做 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, μg/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(μg/mL)。
- 2、计算公式

### (1) 按照蛋白浓度计算

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

### (2) 按照样本质量计算

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

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

### (4) 按照血清(浆)体积计算

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

$V_{\text{样}}$ : 加入样本体积,  $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$ ;  $V_{\text{上清}}$ : 提取液一提取时上清液体积,  $0.8\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ; 细胞或细菌数量, 以  $10^4$  计;  $V_{\text{提取液一}}$ : 加入提取液一体积,  $1\text{mL}$ ;  $V_{\text{提取液二}}$ : 加入提取液二体积,  $0.15\text{mL}$ ;  $V_{\text{液体}}$ : 液体样本体积,  $0.1\text{mL}$ ;  $0.879$ : 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  $10\text{min}$  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  $1.1875\text{mL PBS}$ (生理盐水) 匀浆; 取相同体积的血清(浆), 用  $1.206\text{mL PBS}$ (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 $\Delta A$  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 $\mu\text{L}$  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 $\Delta A$  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( $\mu\text{g/mL}$ )= $11.482 \times x = 398.7 \mu\text{g/mL}$ 。