

肌酸含量检测试剂盒可见分光光度法

中文名称：肌酸含量检测试剂盒可见分光光度法

英文名称：Creatine Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20°C

检测方法：可见分光光度法

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 30mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 5mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂一稀释液	液体 15 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 15mL×1 瓶	-20°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

试剂一：临用前加 1mL 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。

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 3T）的比例进行配制，现配现用，当天用完；

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 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、低温离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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. 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°C 12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞: 按照细胞数量 (10⁶ 个): 提取液一体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例 (建议 5×10⁶ 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 505nm, 蒸馏水调零。

2、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	100	100	-	-
蒸馏水	-	100	100	-
标准溶液	-	-	-	100
试剂一工作液	200	200	200	200
试剂二	100		100	100
室温避光反应 10min				
蒸馏水	600	-	100	100
充分混匀, 测定 530nm 处的吸光度。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:

以一水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

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

(2) 按照样本质量计算

$$\text{肌酸含量 } (\mu\text{g}/\text{g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 = 1.044 \times x \div W$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

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

(4) 按照血清(浆)体积计算

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

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 100 μL =0.1 mL; $V_{\text{上清}}$: 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 10⁴ 计; $V_{\text{提取液一}}$:

加入提取液一体积, 1 mL; $V_{\text{提取液二}}$: 加入提取液二体积, 0.15 mL; $V_{\text{液体}}$:

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,

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线性范围吸光值，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 小鼠肌肉加入 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，离心取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=1.335-0.058=1.277，带入标准曲线 $y=0.0118x+0.0343$ ，计算 $x=105.3$ 。按样本质量计算含量得：

肌酸含量 ($\mu\text{g/g}$ 质量) = $1.044 \times x \div W \times 2$ (稀释倍数) = $2198.7 \mu\text{g/g}$ 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，测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.596-0.069=0.527，带入标准曲线 $y=0.0118x+0.0343$ ，计算 $x=41.754$ 。按照液体体积计算含量得：肌酸含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $11.482 \times x = 479.4 \mu\text{g/mL}$ 。