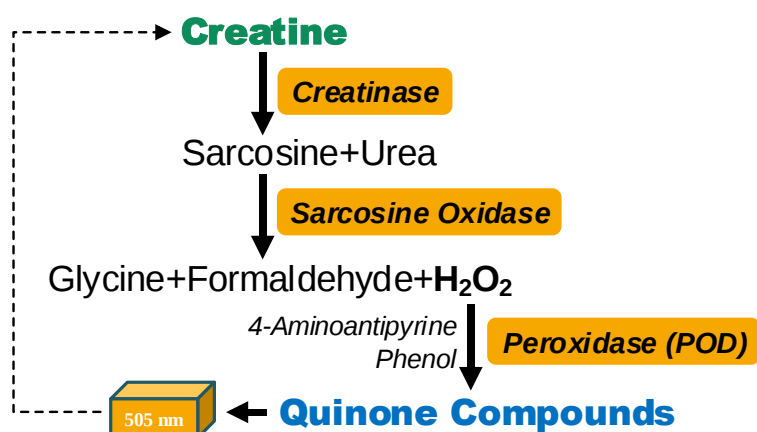




肌酸含量检测试剂盒（肌酸酶法）

Creatine Content Assay Kit (Creatinase Method)



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



肌酸含量检测试剂盒（肌酸酶法）

Creatine Content Assay Kit (Creatinase Method)

一、产品描述

肌酸是一种含氮化合物，自然存在于脊椎动物体内，主要由精氨酸、甘氨酸及甲硫氨酸三种氨基酸组成，并能够与磷酸结合形成磷酸肌酸，存储在肌肉细胞中为肌肉和神经细胞提供能量，其含量变化与肌肉质量和功能密切相关，并在能量代谢、疾病分析和营养研究等领域具有重要应用。

肌酸酶偶联肌氨酸氧化酶，可将肌酸转化为甘氨酸、甲醛和过氧化氢，过氧化物酶进一步催化过氧化氢氧化 4-氨基安替比林偶联酚，生成红色醌类化合物，产物在 505 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测肌酸的含量。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液 A		液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B		液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一		粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月，避免反复冻融)
试剂二		粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 200 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月，避免反复冻融)
试剂三		粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 500 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月，避免反复冻融)
试剂四	组分 A	液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	使用前按组分 A:组分 B=1:1 体积比配制 (根据使用量现用现配)
	组分 B	液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品		粉剂×1 支 (1 mg 肌酸标准品)	4°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 1 mg/mL 肌酸标准液)
标准应用液的制备（现用现配）：检测前将 1 mg/mL 肌酸标准液使用蒸馏水稀释至 200 μg/mL 即为标准应用液。				

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：吸取 100 μL 液体样本加入 1 mL 提取液 A，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2. 测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 505 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
待测样本	50	50	-	-
标准应用液	-	-	50	-
蒸馏水	-	50	-	50
试剂一	50	-	50	50
37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）反应 10 min				
试剂二	5	5	5	5
试剂三	5	5	5	5
试剂四	400	400	400	400
37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）反应 30 min				
蒸馏水	500	500	500	500

吸光值测定（10 min 内完成测定）：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 505 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。
注：每个样本均需设一个对照管，空白管只需测 1-2 次。

3.肌酸含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{肌酸含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 样} \times 0.879}{C_{\text{pr}} \times \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样}} = \frac{175.8 \times \Delta A \text{ 测定}}{C_{\text{pr}} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{肌酸含量 } (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提 B}) \times V \text{ 提 A} \times 0.879}{W \times \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 上清}} = \frac{208.76 \times \Delta A \text{ 测定}}{W \times \Delta A \text{ 标准}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{肌酸含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提 B}) \times V \text{ 提 A} \times 0.879}{\text{Cell} \times \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 上清}} = \frac{208.76 \times \Delta A \text{ 测定}}{\text{Cell} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{肌酸含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提 B}) \times (V \text{ 提 A} + V \text{ 液}) \times 0.879}{\Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 上清} \times V \text{ 液}} = \frac{2296.39 \times \Delta A \text{ 测定}}{\Delta A \text{ 标准}}$$

注释： C 标：标准应用液浓度，200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.05 mL；V 上清：提取过程中吸取上清液的体积，0.8 mL；V 提 A：提取过程中加入提取液 A 的体积，1 mL；V 提 B：提取过程中加入提取液 B 体积，0.15 mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；Cell：细菌或细胞数量，以万计；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，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， $131.13 \div 149.15 = 0.879$ 。

四、注意事项

- ①反应完成后应在 10 min 内完成吸光值测定，若样本数量较多建议分批进行测定；
- ②提取液中含有蛋白沉淀组分，待测样本不能用于蛋白含量测定；若使用蛋白浓度计算肌酸含量，则需要另取样本使用 PBS 或生理盐水按照相同步骤制备为待测样本，再进行蛋白浓度测定；
- ③若 ΔA 测定大于 0.8，建议将待测样本适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

