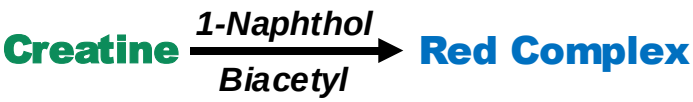
肌酸含量检测试剂盒（联乙酰-α-萘酚法）

Creatine Content Assay Kit (Diacetyl-α-Naphthol Method)



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

Catalog Number **AKNM009-2C**
Storage Temperature **2-8°C**
Size **50T/24S**

Visible Spectrophotometry

肌酸含量检测试剂盒（联乙酰-α-萘酚法）

Creatine Content Assay Kit (Diacetyl-α-Naphthol 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。

肌酸在碱性条件下能够与联乙酰-α-萘酚反应生成红色化合物，产物在 530 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×1 支	4°C保存	**使用前加入 1 mL 无水乙醇充分溶解** （分装后-20°C可保存 2 周，避免反复冻融）
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	液体 5 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）
标准稀释液的制备：将 1 mg/mL 肌酸标准液使用蒸馏水稀释至 100、80、40、20、10、5 μg/mL 即为标准稀释液。			

需自备试剂：无水乙醇（C_2H_6O，MW = 46.07，CAS: 64-17-5）

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度（μg/mL）	1000	1000	80	40	20	10
标准液体积（μL）	100	80	500	500	500	500
蒸馏水体积（μL）	900	920	500	500	500	500
稀释后浓度（μg/mL）	100	80	40	20	10	5

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、台式离心机和蒸馏水。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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。

注：提取液 B 加入时会产生大量气泡，应缓慢加入并吹打混匀至无气泡产生，建议使用 2 mL 离心管。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 530 nm，蒸馏水调零。

②**检测工作液的配制（现用现配）：**根据使用量按试剂一：试剂二=1:14 体积比配制，充分混匀。

③在离心管中依次加入下列试剂**（避光条件下进行）：**

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
待测样本	100	100	-	-
标准稀释液	-	-	100	-
蒸馏水	-	100	-	100
检测工作液	200	200	200	200
试剂三	100	-	100	100
充分混匀，室温避光反应 10 min				
蒸馏水	600	600	600	600

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 ΔA 测定=A 测定-A 对照，ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：每个样本均需设一个对照管，空白管只需测 1-2 次。

标准曲线的建立：以 100、80、40、20、10、5 μg/mL 标准稀释液浓度为横坐标（x），以其对应的ΔA 标准为纵坐标(y)，绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，将ΔA 测定带入公式中得到 x(μg/mL)。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

3.肌酸含量计算

①按组织蛋白浓度计算

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

②按组织样本质量计算

$$肌酸含量（\mu g/g）= \frac{x\times(V_{上清}+V_{提B})\times V_{提A}\times 0.879}{W\times V_{上清}} = \frac{1.044\times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$肌酸含量（\mu g/10^4\ cell）= \frac{x\times(V_{上清}+V_{提B})\times V_{提A}\times 0.879}{细菌或细胞数量\times V_{上清}} = \frac{1.044\times x}{细菌或细胞数量}$$

④按液体样本体积计算

$$肌酸含量（\mu g/mL）= \frac{x\times(V_{上清}+V_{提B})\times(V_{提A}+V_{液})\times 0.879}{V_{上清}\times V_{液}} = 11.482\times x$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.1 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；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；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÷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试剂二应密封保存，若试剂颜色变为深棕色则停止使用；

③试剂一和试剂二具有一定刺激性，请采取适当防护措施并避免接触试剂；

④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；

⑤若 A 测定超出标曲吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

⑥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.