

肌酸含量(肌氨酸氧化酶法)检测试剂盒96样

规格：微量法 100管/96样

编号：JLC_K14845

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。肌酸补充剂是一种运动性能增强剂，也用于治疗肌肉和神经退行性等疾病，因此肌酸的检测在研究和开发中具有广泛的应用。

测定原理

肌酸在肌酸酶的作用下生成肌氨酸，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紫色，该有色物质在546nm有最大吸收峰，进而计算得到肌酐含量。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液A：110mL×1瓶，4℃避光保存；

提取液B：60mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：20mL×1瓶，-20℃避光保存；

标准品：粉剂×1瓶，4℃避光保存，使用前甩几下使粉剂落入底部，再加1mL蒸馏水充分溶解即标准品浓度为1mg/mL，再用蒸馏水稀释40倍(1:39份水)成0.025mg/mL，即190.65umol/L的肌酸标准品待测液；

(提取液A和提取液B有腐蚀性，操作时注意佩戴手套)

样品提取

一、组织样本的处理：

1、按照质量(g)：提取液A体积(mL)为 1：5~10的比例加入提取液，冰浴匀浆；

(建议先尝试0.2g：1mL的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)

2、然后12,000g离心力 10°C 离心10min，取上清液；

(动物样本可能会有飘浮在上层的脂肪，注意不要吸取到)

3、取300μL上清液，滴加提取液B 300μL；

(加入后会有白色沉淀产生为正常现象；)

4、然后12,000g离心力 10°C 离心5min，取上清液待测 (记为样本待测液)；

二、液体样本处理：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测；

测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，设置温度再37°C，调节波长至546nm。

2、在EP管中加入下列试剂：

试剂 (μL)	测定管	空白管(只做一管)	标准管(只做一管)
样本	10		
蒸馏水		10	
标准品			10
试剂一	190	190	190
混匀，546nm处测定吸光值A137°C孵育15min后于546nm处读取吸光值A2 $\Delta A = A2 - A1$			

注意：

1. 如果 ΔA 大于1，需要将样本用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。

2. 如果 ΔA 的值小于0.01，可增加样本加样体积V1(如由10uL增至20uL或更多，则试剂二相应减少，空白管和标准管变化同测定管)，或增加样本取样质量W；则改变后的V1和W需带入公式重新计算。

结果计算

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量(nmol/g)} &= (\text{C标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A测定} - \Delta\text{A空白}) \div (\Delta\text{A标准} - \Delta\text{A空白}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \\ &= 381.3 \times (\Delta\text{A测定} - \Delta\text{A空白}) \div (\Delta\text{A标准} - \Delta\text{A空白}) \div \text{W} \times \text{D}\end{aligned}$$

2、按液体体积计算：

$$\begin{aligned}\text{肌酸含量(umol/L)} &= (\text{C标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A测定} - \Delta\text{A空白}) \div (\Delta\text{A标准} - \Delta\text{A空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 190.65 \times (\Delta\text{A测定} - \Delta\text{A空白}) \div (\Delta\text{A标准} - \Delta\text{A空白}) \times \text{D}\end{aligned}$$

V：加入提取液体积，2 mL；

V1：加入样本体积，0.01mL；

V2：加入标准品体积，0.01mL；

D：稀释倍数，未稀释为1；

W：样本质量，g；

C标准：肌酸标准品，0.025mg/mL=190.65umol/L=190.65nmol/mL；

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。