



## 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**

英文名称：Creatine Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：2-8°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℃，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℃ 12000g 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℃，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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。

3. 血清（浆）等液体：取 100μL 液体加入 1mL 提取液一，4℃ 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(μL)	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。 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$ 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, μg/mL)，以  $\Delta A$  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  $\Delta A$  测定带入方程求得  $x$  ( $\mu\text{g/mL}$ )。

## 2、计算公式

(1) 按照蛋白浓度计算

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

(2) 按照样本质量计算

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

(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

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

$V_{\text{样}}$ : 加入样本体积,  $100\mu\text{L}=0.1 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{上清}}$ : 提取液一提取时上清液体积,  $0.8 \text{ mL}$ ;

$\text{Cpr}$ : 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  $149.15$ ,

### 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  $1.1875\text{mLPBS}$  (生理盐水) 匀浆；取相同体积的血清 (浆)，用  $1.206\text{mLPBS}$  (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  $\Delta A$  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 $\mu\text{L}$  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，测得计算  $\Delta A$  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 ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $11.482 \times x = 479.4 \mu\text{g/mL}$ 。