

## 肌酸含量（酶法）检测试剂盒说明书

（货号:ADS-F-FM025-48 分光法 48 样）

### 一、产品简介：

肌酸是一种内源性化合物，其功能是通过肌酸激酶的磷酸化使机体维持高的ATP/ADP比率。肌酸补充剂是一种运动性能增强剂，亦用于治疗肌肉和神经退行性疾病。因此肌酸的检测在研究和开发中具有广泛的应用。

本试剂盒利用肌酸酶特异作用于肌酸生成肌氨酸，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（粉）红色，该有色物质在520nm有最大吸收峰，进而计算得到肌酸含量。

### 二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部，再加 1.1mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉体 1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部，再加 1.1mL 的蒸馏水溶解备用。
标准管	液体 1mL×1 支	4℃保存	临用前用蒸馏水稀释5倍，即0.2mg/mL肌酸溶液

### 三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

### 四、肌酸含量检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

取约 0.1g 组织样本，加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，常温离心 10min，上清液待测。

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

##### ③ 液体样品：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

#### 2、上机检测：

- ①可见分光光度计预热 30min，设置温度在 37°C，设定波长到 520nm，蒸馏水调零。
- ②做实验前选取 2 个样本，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。
- ③所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	40		
蒸馏水		40	
标准品			40
试剂一	420	420	420
试剂二	300	300	300
试剂三	20	20	20
混匀，37°C避光孵育 10min。			
试剂四	20	20	20
混匀，37°C避光反应 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 处读取吸光值 A（直到 A 值不变）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

- 【注】**：1. 测定管的 A 值若超过 1，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。
2. 若  $\Delta A$  的值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 40 $\mu\text{L}$  增至 100 $\mu\text{L}$ ，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量 W；则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。
2. 若样本自身含有高的肌氨酸含量，需增设一个样本自身对照：  
（即 40 $\mu\text{L}$  样本+440 $\mu\text{L}$  试剂一+300 $\mu\text{L}$  试剂二+20 $\mu\text{L}$  试剂三）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

## 五、结果计算：

### 1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\mu\text{mol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \div V \times W) \times D \times 10^3 \div Mr \\ &= 1.53 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div W \end{aligned}$$

### 2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \div V \times 500) \times D \times 10^6 \div Mr \\ &= 3.05 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

### 3、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\mu\text{mol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \times 10^6 \div Mr \\ &= 1525.2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，0.2mg/mL；

Mr---标准品分子量，131.13；

V---提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

500---细胞数量，百万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。