

肌酸含量（酶法）检测试剂盒说明书

（微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 11mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×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，可-20℃分装冻存，禁止反复冻融。
试剂四	粉体 mg×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，可-20℃分装冻存，禁止反复冻融。
标准管	液体 1mL×1 支	4℃保存	临用前用蒸馏水稀释 2 倍，即 0.5mg/mL肌酸溶液。

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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（ 10^4 ）：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酶标仪预热 30min，设置温度在 37℃，设定波长到 520nm。

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 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	空白管 （仅做一次）	标准管 （仅做一次）
样本	10		
蒸馏水		10	
标准品			10
试剂一	100	100	100
试剂二	70	70	70
试剂三	10	10	10
混匀，37℃避光孵育 10min，			
试剂四	10	10	10
混匀，37℃避光反应 30min，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，可用蒸馏水对样本进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若 ΔA 的值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 10μL 增至 50μL，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。

3. 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 10μL 样本+110μL 试剂一+70μL 试剂二+10μL 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：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\mu\text{mol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \div V \times W) \times D \times 10^3 \div Mr \\ &= 3.81 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div W \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \div V \times 500) \times D \times 10^6 \div Mr \\ &= 7.63 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\mu\text{mol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \times 10^6 \div Mr \\ &= 3813 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，0.5mg/mL；

Mr---标准品分子量，131.13；

V---提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。