



肌酐含量检测试剂盒（肌氨酸氧化酶法）

Creatinine (Cr) Content Assay Kit

微量法

产品编号：AK531M

产品规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES531-1	110 mL×1 瓶	4℃保存
ES531-2	20 mL×1 瓶	4℃保存
AK531-A	粉剂×2 支	-20℃保存；临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融；
AK531-B	粉剂×2 支	-20℃保存；临用前加入 1.05 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融；
AK531-C	粉剂×2 支	-20℃保存；临用前取一支加入 1 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融；使用前根据实验所需用量，按照试剂 C：蒸馏水=1:9 的比例，充分混匀，现配现用；
AK531-D	粉剂×1 支	4℃保存；临用前取一支加入 1 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两个月，禁止反复冻融；
AK531-E	粉剂×2 瓶	-20℃保存；临用前加入 2.2 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融；
AK531-F-1	5 mL×1 瓶	4℃保存；临用前根据实验所需用量，按照试剂 F-1 液：试剂 F-2 液=1:1 的比例，充分混匀，现用现配；
AK531-F-2	5 mL×1 瓶	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存；临用前加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，即 1 mg/mL 标准储备液，4℃保存 1 个月。临用前取 50μL 和 200μL 蒸馏水混合配制成 200μg/mL 的标准溶液备用，现用现配。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：肌酐（creatinine, Cr），化学式是 $C_4H_7N_3O$ ，是肌肉在人体内代谢的产物，主要由肾小球滤过排出体外。血中肌酐来自外源性和内源性两种，外源性肌酐是肉类食物在体内代谢后的产物；内源性肌酐是体内肌肉组织代谢的产物。

原理：肌酐在肌酸酶的催化下肌酸水解生成肌氨酸和尿素，肌氨酸在肌氨酸氧化酶的催化下氧化产生过氧化氢。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。

自备用品：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、研钵/匀浆器、蒸馏水。

粗酶液提取：

1. 组织样本：按照质量（g）：ES531-1 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1mL ES531-1）加入 ES531-1，冰浴匀浆后于 4℃，12000 g 离心 10 min，取 0.8 mL 上清液，再加入 0.15 mL ES531-2，混匀，4℃，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。
2. 血清样本：取 100 μL 血清（浆）加入 1 mL ES531-1，4℃，12000 g 离心 10 min，取 0.8 mL 上清液，再加入 0.15 mL ES531-2，4℃，混匀，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。
3. 细胞样本：按照细胞数量（ 10^4 个）：ES531-1 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL ES531-1），冰浴超声波破碎细胞（功率 300W，超声 3 秒，间隔 9 秒，总时间 5 min）；于 4℃，12000

g 离心 10 min，取 0.8 mL 上清液，再加入 0.15 mL ES531-2，混匀，4℃，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。

测定步骤：

- 1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 505nm，蒸馏水调零。
- 2. 操作表：按下表加入下列试剂

	测定管 (μL)	空白管 (μL)	标准管(μL)
样本	20		
蒸馏水		20	
标准液			20
AK531-A	20	20	20
AK531-B	20	20	20
AK531-C (工作液)	5	5	5
AK531-D	5	5	5
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）条件下，反应 10 min。			
AK531-E	40	40	40
AK531-F	90	90	90
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）条件下，显色 30 min。测定 505 nm 处的吸光度；分别记为 A 测定、A 空白、A 标准。ΔA 测=A 测定-A 空白，ΔA 标=A 标准-A 空白（空白管只需做 1-2 次）。			

CK 活性计算公式：

- 1. 按蛋白浓度计算：
$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = \text{C 标} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = 200 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{Cpr}$$
- 2. 按样本鲜重计算：
$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) &= \text{C 标} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{ES531-2}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{ES531-1}}) \\ &= 237.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \end{aligned}$$
- 3. 按照细菌或细胞数量计算：
$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= \text{C 标} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{ES531-2}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{ES531-1}}) \\ &= 237.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$
- 4. 按照血清（浆）体积计算：
$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= \text{C 标} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{ES531-2}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{ES531-1}} + V_{\text{液体}})] \\ &= 2612.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \end{aligned}$$

C 标：标准管浓度，200 μg/mL；V 样：加入样本体积，20 μL=0.02 mL；V 上清：提取时上清液体积，0.8 mL；V ES531-1：加入 ES531-1 体积，1 mL；V ES531-2：加入 ES531-2，0.15 mL；W：样本质量，g；Cpr： 样本蛋白浓度，mg/mL；细胞数量：以 10⁴ 计；V 液体：液体样本体积，0.1 mL。

注意事项：

- 1. 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酐含量需要 另取样本，即取相同质量的组织、同等数目的细菌或细胞，用 1.1875mLPBS（生理盐水）匀浆；取相同体积的血清（浆），用 1.206mLPBS（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。
- 2. 如果测定吸光值超过标准管吸光值，建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定。如果 ΔA 测定小于 0.01，建议增大样本量后再进行测定。样本蛋白质含量需要另外测定。