



肌酐含量检测试剂盒（肌氨酸氧化酶法）

Creatinine (Cr) Content Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK531V

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES531-1	60 mL×1 瓶	4℃保存
ES531-2	8 mL×1 瓶	4℃保存
AK531-A	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加 1.7mL 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 1.65 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 3.4 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	10 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	10 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、1cm 玻璃比色皿、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 1 mL 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 505 nm，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	60		
蒸馏水		60	
标准液			60
AK531-A	60	60	60
AK531-B	60	60	60
AK531-C 工作液	15	15	15
AK531-D	15	15	15
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）条件下，反应 10 min。			
AK531-E	120	120	120
AK531-F	270	270	270
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）条件下，显色 30 min。			
蒸馏水	400	400	400
充分混匀，测定 505 nm 处的吸光度；分别记为 A 测定、A 空白、A 标准。 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ （空白管只需做 1-2 次）。			

CK 活性计算公式：

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

C 标：标准管浓度，200 μg/mL；V 样：加入样本体积，60 μL=0.06 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 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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。