



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	10 mL×1 瓶	4℃保存
AK531-A	17 mL×1 瓶	-20℃保存，避免反复冻融
AK531-B	10 mL×1 瓶	4℃保存
AK531-C	10 mL×1 瓶	4℃保存
AK531-D	粉剂×1 支	-20℃保存；临用前加入 10 mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
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 10 mg/mL 标准储备液，4℃保存 1 个月。临用前取 20μL 和 980μL 蒸馏水混合配制 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 C₄H₇N₃O，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、1ml 玻璃比色皿、恒温水浴锅、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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. 液体样本：直接检测，若有浑浊可离心后取上清待测。
3. 细胞样本：按照细胞数量 (10⁴ 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。

注：1. ES531-2 需缓慢加入，加入后产生大量气泡，建议使用 2ml EP 管进行操作。

2. 建议使用新鲜样本进行检测，防止因样本保存不当或时间过长，引起测定偏差。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 505nm，蒸馏水调零，分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液配制：临用前根据样本量按试剂 A:试剂 B=280ul:180ul(共 460ul, 1T)的比例配制工作液。
3. 临用前工作液、试剂 C、试剂 D 平衡至常温。

4. 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	80		
蒸馏水		80	
标准液			80
工作液	460	460	460
充分混匀，37℃条件下，反应 20 min			
AK531-C	180	180	180
AK531-D	160	160	160
充分混匀，37℃条件下，测定 30s 和 15 min 30s 处 505 nm 的吸光度；分别记为 A 测 1、A 测 2， ΔA 测=A2-A1。		充分混匀，37℃条件下，显色 15 min。测定 505 nm 处的吸光度；分别记为 A 空白、A 标准， ΔA 标=A 标准-A 空白（标准管和空白管只需做 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. 按照液体体积计算：

$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} = 200 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}$$

C 标：标准管浓度，200 μg/mL；V 样：加入样本体积，80 μL=0.08 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 ΔA 测吸光值超过 0.7，建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定。如果 ΔA 测小于 0.01，建议增大样本量后再进行测定。
3. 尽量在 10min 内完成显色。