

## 肌酐含量检测试剂盒（肌氨酸氧化酶法）（微量法）

产品货号：BA1878

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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。

样品中的肌酐在肌酐酶的催化下水解生成肌酸。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。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	4°C
提取液二	液体20mL×1瓶	4°C
试剂一	粉剂×2支	-20°C
试剂二	粉剂×2支	-20°C
试剂三	粉剂×2支	-20°C
试剂四	粉剂×1支	4°C
试剂五	粉剂×2支	-20°C
试剂六A液	液体5mL×1瓶	4°C
试剂六B液	液体5mL×1瓶	4°C
标准品	粉剂×1支	4°C

### 溶液的配制：

1. 试剂一：临用前每支加入1.1mL蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20°C分装保存两周。
2. 试剂二：临用前每支加入1.05mL蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20°C分装保存两周。
3. 试剂三：临用前每支加入1mL蒸馏水（100T/96S），充分溶解。为方便储存故多给一支。用不完的试剂-20°C分装保存两周。
4. 试剂三工作液：根据试验所需用量，按照试剂三:蒸馏水=1:9的比例，充分混匀，现配现用。
5. 试剂四：临用前加入1mL蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20°C分装保存两个月。
6. 试剂五：临用前每瓶加入2.2mL蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20°C分装保存两周。
7. 试剂六：临用前根据实验所需用量，按照试剂六A液：试剂六B液=1:1的比例，充分混匀，现用现配。
8. 标准品：1mg肌酐。临用前加入1mL蒸馏水，充分溶解，即1mg/mL标准储备液，4°C保存1个月。临用前将其稀释至200 $\mu$ g/mL作为标准液待测。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、超声破碎仪。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

### 操作步骤:

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可参考文献）

1. 细菌、细胞样本的制备：按照细胞数量（ $10^4$ 个）：提取液一体积（mL）为 500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液一），冰浴超声波破碎细胞（功率300W，超声3秒，间隔9秒，总时间5min）；于4℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.15mL提取液二，混匀，4℃，12000g离心10min后取上清待测。
2. 组织样本的制备：按照质量（g）：提取液一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后于4℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.15mL提取液二，混匀，4℃，12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清（浆）：取100μL血清（浆）加入1mL提取液一，4℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.15mL提取液二，混匀，4℃，12000g离心10min后取上清待测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至505nm，蒸馏水调零。
2. 按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	空白管	标准管
样本	20	-	-
蒸馏水	-	20	-
标准液	-	-	20
试剂一	20	20	20
试剂二	20	20	20
试剂三工作液	5	5	5
试剂四	5	5	5
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）条件下，反应 10min。			
试剂五	40	40	40
试剂六	90	90	90
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）条件下，显色 30min。测定 505nm 处的吸光度。分别记为 A 测定、A 空白、A 标准。 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 空白， $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。			

注：空白管只需做 1-2 次。

#### 三、肌酐含量计算

##### 1. 计算公式

##### (1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) = 200 \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \div C_{\text{pr}}$$

##### (2) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) &= C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div (W \times V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) \\ &= 237.5 \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \div W \end{aligned}$$

##### (3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) \\ &= 237.5 \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

##### (4) 按照血清（浆）体积计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div [V \text{ 液体} \times V \text{ 上清} \div (V \text{ 提取液一} + V \text{ 液体})] \\ &= 2612.5 \times \Delta A \text{ 测} \div \Delta A \text{ 标} \end{aligned}$$

C 标：标准管浓度，200μg/mL；V 样：加入样本体积，20μL=0.02mL；V 上清：提取时上清液体积，0.8mL；V 提取液一：加入提取液一体积，1mL；V 提取液二：加入提取液二体积，0.15mL；W：样本质量，g；Cpr：样



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

本蛋白浓度，mg/mL；细胞数量：以  $10^4$  计；V 液体：液体样本体积，0.1mL。

#### 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  $\Delta A$  测定小于 0.01，建议增大样本量后再进行测定。

#### 实验实例：

1. 取 0.1g 小鼠肌肉加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨离心，取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测=A 测定-A 空白=0.199-0.054=0.145， $\Delta A$  标=A 标准-A 空白=0.483-0.054=0.429。按样本质量计算含量得：  
肌酐含量（ $\mu\text{g/g}$  质量）= $237.5 \times \Delta A$  测  $\div$   $\Delta A$  标  $\div$  W=802.7 $\mu\text{g/g}$  质量。
2. 取 100 $\mu\text{L}$  牛血清加入 1mL 提取液一，取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清，之后按照测定步骤操作，测得计算  $\Delta A$  测=A 测定-A 空白=0.138-0.054=0.084， $\Delta A$  标=A 标准-A 空白=0.483-0.054=0.429。按照液体体积计算含量得：  
肌酐含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）= $2612.5 \times \Delta A$  测  $\div$   $\Delta A$  标=511.5 $\mu\text{g/mL}$  血清。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>