

肌酐（Cr）含量检测试剂盒说明书（肌氨酸氧化酶法）

可见分光光度法

货号：AC10758

规格：50T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存
提取液二	液体 8 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	4℃保存
试剂五	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂六 A 液	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存
试剂六 B 液	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存
标准品	粉剂×1 支	4℃保存

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前每支加入 1.7 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20℃分装保存两周。
2. 试剂二：临用前每支加入 1.65 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20℃分装保存两周。
3. 试剂三：临用前每支加入 1 mL 蒸馏水（50T/48S），充分溶解。为方便储存故多给一支。用不完的试剂-20℃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 1 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20℃分装保存两个月。
6. 试剂五：临用前每瓶加入 3.4 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂-20℃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：1 mg 肌酐。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 50 μ L 和 200 μ L 蒸馏水混合配制成 200 μ g/mL 的标准溶液备用，现用现配。

产品说明：

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。

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。

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、超声破碎仪。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌、细胞样本的制备：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液一（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 5 min）；于 4℃，12000g 离心 10 min，取 0.8 mL 上清液，再加入 0.15 mL 提取液二，混匀，4℃，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。

2、组织样本的制备：按照质量（g）：提取液一（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1mL 提取液一）加入提取液一，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 提取液二，混匀，4℃，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。

3、血清（浆）：取 100 μ L 血清（浆）加入 1 mL 提取液一，4℃，12000 g 离心 10 min，取 0.8 mL 上清液，再加入 0.15 mL 提取液二，混匀，4℃，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 505 nm，蒸馏水调零。

2、按下表步骤加样：

试剂名称（ μ L）	测定管	空白管	标准管
样本	60	-	-
蒸馏水	-	60	-
标准液	-	-	60
试剂一	60	60	60
试剂二	60	60	60
试剂三工作液	15	15	15
试剂四	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。			
试剂五	120	120	120
试剂六	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。 $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ 。			

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, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 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 提取液一: 加入提取液一体积, 1 mL; V 提取液二: 加入提取液二体积, 0.15 mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10^4 计; V 液体: 液体样本体积, 0.1 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。

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, 测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.159 - 0.016 = 0.143$, $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.373 - 0.016 = 0.357$ 。按样本质量计算含量得:

$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) = 237.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W = 951.3 \mu\text{g}/\text{g 质量}。$$

2、取 100 μL 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 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.095 - 0.079 = 0.079$, $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.373 - 0.016 = 0.357$ 。按照液体体积计算含量得:

$$\text{肌酐含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) = 2612.5 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} = 578 \mu\text{g}/\text{mL 血清}。$$