

使用说明书

Instruction Manual

肌酐含量检测试剂盒（肌氨酸氧化酶法）（微量法）

Creatinine (Cr) Content Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0057M-ES1	110mL×1 瓶	4℃保存。
CB0057M-ES2	20mL×1 瓶	4℃保存。
CB0057M-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。
CB0057M-B	粉剂×2 支	-20℃保存；临用前加入 1.05mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
CB0057M-C	粉剂×2 支	-20℃保存；临用前取一支加入 1mL 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。
CB0057M-D	粉剂×1 支	4℃保存；临用前取一支加入 1mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两个月，禁止反复冻融。
CB0057M-E	粉剂×2 瓶	-20℃保存；临用前加入 2.2mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
CB0057M-F-1	5mL×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。
CB0057M-F-2	5mL×1 瓶	
CB0057M-Standard	粉剂×1 支	4℃保存；临用前加入 1mL 蒸馏水，充分溶解，即 1mg/mL 标准储备液，4℃保存 1 个月。临用前取 50 μL 和 200 μL 蒸馏水混合配制成 200 μg/mL 的标准溶液备用，现用现配。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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。

二、粗酶液提取：

1. 组织样本：按照质量（g）：CB0057M-ES1 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1mL CB0057M-ES1）加入 CB0057M-ES1，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 CB0057M-ES2，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 CB0057M-ES1，4℃，12000 g 离心 10 min，取 0.8 mL 上清液，再加入 0.15 mL CB0057M-ES2，4℃，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（10⁴ 个）：CB0057M-ES1 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL CB0057M-ES1），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 CB0057M-ES2，混匀，4℃，12000 g 离心 10 min 后取上清待测。

三、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：

试剂名称	测定管（μL）	空白管（μL）	标准管（μL）
样本	20		
蒸馏水		20	
标准液			20
CB0057M-A	20	20	20
CB0057M-B	20	20	20
CB0057M-C（工作液）	5	5	5
CB0057M-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。			
CB0057M-E	40	40	40
CB0057M-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）。			

四、活性计算公式：

1. 按蛋白浓度计算：
肌酐含量（μg/mg prot）= C 标×ΔA 测÷ΔA 标×V 样÷（V 样×Cpr）=200×ΔA 测÷ΔA 标÷Cpr
2. 按样本鲜重计算：
肌酐含量（μg/g 质量）= C 标×ΔA 测÷ΔA 标×（V 上清+V CB0057M-ES2）÷（W×V 上清÷V CB0057M-ES1）
= 237.5×ΔA 测÷ΔA 标÷W
3. 按照细菌或细胞数量计算：
肌酐含量（μg/10⁴ cell）= C 标×ΔA 测÷ΔA 标×（V 上清+V CB0057M-ES2）÷（细胞数量×V 上清÷V CB0057M-ES1）
= 237.5×ΔA 测÷ΔA 标÷细胞数量
4. 按照血清（浆）体积计算：
肌酐含量（μg/mL）= C 标×ΔA 测÷ΔA 标×（V 上清+V CB0057M-ES2）÷ [V 液体×V 上清÷（V CB0057M-ES1+V 液体）]
= 2612.5×ΔA 测÷ΔA 标
注：C 标：标准管浓度，200μg/mL；V 样：加入样本体积，20μL=0.02 mL；V 上清：提取时上清液体积，0.8mL；V CB0057M-ES1：加入 CB0057M-ES1 体积，1mL；V CB0057M-ES2：加入 CB0057M-ES2，0.15mL；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，0.1mL。

■ 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 1.1875mL PBS（生理盐水）匀浆；取相同体积的血清（浆），用 1.206mL PBS（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。
3. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

