

使用说明书

Instruction Manual

肌酐含量检测试剂盒（肌氨酸氧化酶法）（分光光度法）

Creatinine (Cr) Content Assay Kit (Spectrophotometry)

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

50T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0057S-ES1	60mL×1 瓶	4℃保存。
CB0057S-ES2	8mL×1 瓶	4℃保存。
CB0057S-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。
CB0057S-B	粉剂×2 支	-20℃保存；临用前加入 1.65mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
CB0057S-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。
CB0057S-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。
CB0057S-E	粉剂×2 瓶	-20℃保存；临用前加入 3.4mL 蒸馏水溶解；用不完的分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
CB0057S-F-1	10mL×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。
CB0057S-F-2	10mL×1 瓶	
CB0057S-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、1cm 玻璃比色皿、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):CB0057S-ES1 体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1 g 组织,加入 1mL CB0057S-ES1)加入 CB0057S-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 CB0057S-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 CB0057S-ES1,4℃,12000 g 离心 10 min,取 0.8 mL 上清液,再加入 0.15 mL CB0057S-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):CB0057S-ES1 体积(mL)为 500~1000:1 的比例(建议 500 万细胞加入 1 mL CB0057S-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 CB0057S-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 505 nm,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	60		
蒸馏水		60	
标准液			60
CB0057S-A	60	60	60
CB0057S-B	60	60	60
CB0057S-C 工作液	15	15	15
CB0057S-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。			
CB0057S-E	120	120	120
CB0057S-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。			
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。 $\Delta A_{测}=A_{测定}-A_{空白}$, $\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$ (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) = $C_{标} \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \times V_{样} \div (V_{样} \times C_{pr}) = 200 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \div C_{pr}$
2. 按样本鲜重计算：
肌酐含量(μg/g 质量) = $C_{标} \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \times (V_{上清} + V_{CB0057S-ES2}) \div (W \times V_{上清} \div V_{CB0057S-ES1})$
= $237.5 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \div W$
3. 按照细菌或细胞数量计算：
肌酐含量(μg/10⁴ cell) = $C_{标} \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \times (V_{上清} + V_{CB0057S-ES2}) \div (细胞数量 \times V_{上清} \div V_{CB0057S-ES1})$
= $237.5 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \div 细胞数量$
4. 按照血清(浆)体积计算：
肌酐含量(μg/mL) = $C_{标} \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \times (V_{上清} + V_{CB0057S-ES2}) \div [V_{液体} \times V_{上清} \div (V_{CB0057S-ES1} + V_{液体})]$
= $2612.5 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标}$

注：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 CB0057S-ES1: 加入 CB0057S-ES1 体积, 1 mL; V CB0057S-ES2: 加入 CB0057S-ES2, 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 1.1875mL 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。

