

肌酐（creatinine, Cre）含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

肌酐是肌肉在人体内代谢的产物，主要由肾小球滤过排出体外。血中的肌酐来源包括外源性和内源性两部分，血肌酐几乎全部经肾小球滤过进入原尿，并且不被肾小管重吸收；内源性肌酐每日生成量几乎保持恒定，严格控制外源性肌酐的摄入时，血肌酐浓度为稳定值，因此，测定血肌酐浓度可以反映肾小球的滤过功能。

测定原理：

肌酐酶可催化肌酐产生肌酸，肌酸酶催化肌酸产生肌氨酸，在 POD 与肌氨酸氧化酶作用下与 4-氨基安替比林反应，在 540nm 下有最大吸光值。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 管，-20℃避光保存；

试剂三：粉剂×1 管，-20℃避光保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存；

试剂五：液体 6mL×1 瓶，4℃保存；

肌酐提取：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g，25℃离心 10min，取上清待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。

3、血清（浆）、尿液等液体样品：直接测定。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

2、试剂的配制：临用前分别在试剂二中加入 0.75mL 试剂一，试剂三中加入 1.5mL 试剂一，试剂四中加入 6mL 试剂一，充分溶解后放在冰上待用，用不完的试剂分装后-20℃保存一周；

3、工作液的配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液

试剂名称（ μ L）	测定工作液	对照工作液
试剂一	60	70
试剂二	10	
试剂三	10	10
试剂四	50	50
试剂五	50	50

4、样本测定

按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
测定工作液	180	
对照工作液		180

37°C 孵育 60min, 540nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

肌酐含量计算:

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.5386x - 0.0081$, $R^2 = 0.9998$; x 为肌酐含量(μmol/mL), y 为吸光值。

2、按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A + 0.0081) \div 0.5386 \\ &= 1.86 \times (\Delta A + 0.0081) \end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0081) \div 0.5386 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \\ &= 1.86 \times (\Delta A + 0.0081) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按照样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0081) \div 0.5386 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 1.86 \times (\Delta A + 0.0081) \div W \end{aligned}$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{肌酐含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0081) \div 0.5386 \times V1] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V2) \\ &= 1.86 \times (\Delta A + 0.0081) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02 mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。