

钙测试盒说明书(精简版)

(货号: C004-2-1 MTB 微板法 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

样本中钙离子在碱性溶液中与甲基百里香酚蓝(MTB)结合,生成蓝色络合物;通过比色与同样处理的钙标准进行比较,可计算出样本中钙的含量。

二、试剂盒组成: (试剂盒有效期 6 个月)

	规 格	组 份	保 存
试剂一	10mL×1 瓶	MTB 试剂	4℃避光
试剂二	20mL×1 瓶	碱性溶液	室温
试剂三	1mL×1 瓶	蛋白澄清剂	室温
试剂四	1mL×1 支	2.5mmol/L 钙标准液	4℃避光
1mmol/L 钙标准液的配制:用去离子水将 2.5mmol/L 钙标准液进行 2.5 倍稀释(即 2:3 稀释),现用现配			
工作液 I 的配制: 试剂一:试剂二 = 1:2 的比例进行配制,现用现配。(测血清(浆)样本用)			
工作液 II 的配制: 试剂一:试剂二:试剂三 = 10:20:1 的比例进行配制,现用现配。(测组织、细胞样本用)			

三、所需仪器及试剂:

可调 610nm 波长的酶标仪, 去离子水。

四、样本要求:

- 1、按常规检验要求采集处理样本, 样本可以是血清、血浆(不能用 EDTA 抗凝)、组织匀浆及细胞、培养上清。
- 2、样本 2~8℃可稳定 3~4 天,-20℃以下可稳定数月。

五、测定步骤:

(一)、血清(浆)、细胞培养液操作步骤:

1、操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
去离子水 (μL)	10		
1mmol/L 钙标准液 (μL)		10	
样本 (μL)			10
工作液 I (μL)	250	250	250
混匀, 静置 5 分钟, 波长 610nm, 酶标仪测各孔 OD 值			

2、计算公式:

样本中钙含量 (mmol/L) = $\frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \times N$

C_{标准}: 标准品浓度, 1mmol/L;

N: 样本测试前稀释倍数。

(二)、组织或细胞的操作:

1、前处理:

组织样本: 准确称取组织重量按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入去离子水, 冰水浴匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取 10%的匀浆上清液待测;

细胞样本: 先收集细胞(贴壁胰酶消化或细胞刮刮下, 转移到离心管中 1000-2000 转/分钟离心 5 分钟后弃去上清留沉淀, 悬浮细胞直接转以后离心收集沉淀), 加 0.5-1mL 的生理盐水清洗 1~2 次, 1000-2000 转/分钟离心收集沉淀细胞, 再加入 0.3~0.5mL 去离子水悬浮细胞, 超声或手动研磨破碎细胞, 破碎后 2000 转/分钟离心 10 分钟后取上清待测。

2、操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
去离子水 (μL)	10		
1mmol/L 钙标准液 (μL)		10	
组织匀浆上清液 (μL)			10
工作液 II (μL)	250	250	250
混匀, 静置 5 分钟, 波长 610nm, 酶标仪测各孔 OD 值			

3、计算公式:

公式一: 钙含量 (mmol/gprot) = $\frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \div Cpr$

或公式二: 钙含量 (mmol/g组织) = $\frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \div \frac{W}{V_{样总}}$

C_{标准}: 标准品浓度, 1mmol/L;

Cpr: 匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);

W: 组织样本质量, g;

V_{样总}: 样本匀浆时匀浆液总体积, L。

六、技术参数:

波长选择范围	600nm~630nm	线性范围	0~2mmol/L
批间差	≤6%	批内差	≤4%
保存条件	试剂盒 4℃避光保存 6 个月		

七、注意事项:

- 1、实验应避免钙污染,建议用一次性 96 孔板操作(本所有售)。
- 2、严重溶血、黄疸或脂血对结果有影响。
- 3、制备组织匀浆时,应选去离子水作为匀浆介质,避免钙污染。
- 4、本试剂盒可上全自动/半自动生化分析仪。
- 5、测定组织或细胞中钙离子含量,推荐同时测定匀浆蛋白浓度(本所有售蛋白定量试剂盒 A045-1 蛋白试剂盒(双缩脲)、A045-2 蛋白试剂盒(考马斯亮蓝)、A045-3 蛋白试剂盒(BCA 法))
- 6、本试剂盒仅用于科研。
- 7、实验前可先将 96 孔板用酶标仪读取并记录空板 OD 值,计算时每孔测得值减去对应空板值后代入计算。

附录 I：钙标准曲线的制备

1、前处理:

用去离子水将 2.5mmol/L 钙标准液稀释成不同的浓度: 0.0625mmol/L、0.125 mmol/L、0.25mmol/L、0.5mmol/L、0.625mmol/L、1mmol/L、2mmol/L。

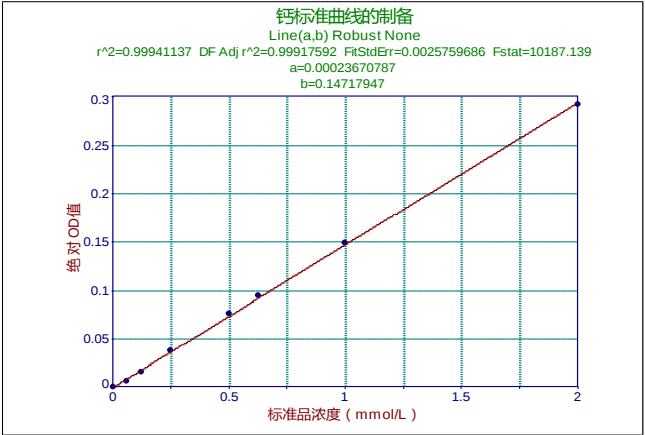
2、操作表:

	空白孔	标准孔
去离子水 (μL)	10	
不同浓度的钙标准液 (μL)		10
工作液 I/工作液 II (μL)	250	250
混匀, 静置 5 分钟, 波长 610nm, 酶标仪测各孔 OD 值		

3、测定结果:

标准品浓度 (mmol/L)	测定 OD 值	绝对 OD 值
0	0.2428	0
0.0625	0.249	0.0062
0.125	0.259	0.0162
0.25	0.2809	0.0381
0.5	0.3195	0.0767
0.625	0.3376	0.0948
1	0.3918	0.1490
2	0.5352	0.2924

4、绘图如下：



注：以上标准曲线用户可以不画，直接用计算公式计算即可。