

钙测试盒

(货号: BC019 MTB 微板法 96T)

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、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。

四、所需仪器及试剂:

酶标仪 (600~630nm) 及 96 孔板 (附送一块), 去离子水, 蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售 BC016)。

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:

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

C_{标准}: 标准品浓度, 1mmol/L;

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例：

例 1：大鼠血清（浆）样本用去离子水 2.5 倍稀释后取样 10 μ L，按说明书操作测得：空白孔 OD 值：0.2428，标准孔 OD 值：0.3918，测定孔 OD 值：0.3699，则计算结果为：

$$\begin{aligned}\text{血清（浆）中钙含量（mmol/L）} &= \frac{0.3699 - 0.2428}{0.3918 - 0.2428} \times 1 \times 2.5 \\ &= 2.1326\text{mmol/L}\end{aligned}$$

例 2：犬血清（浆）样本用去离子水 2.5 倍稀释后取样 10 μ L，按说明书操作测得：空白孔 OD 值：0.2428，标准孔 OD 值：0.3918，测定孔 OD 值：0.3902，则计算结果为：

$$\begin{aligned}\text{血清（浆）中钙含量（mmol/L）} &= \frac{0.3902 - 0.2428}{0.3918 - 0.2428} \times 1 \times 2.5 \\ &= 2.4732\text{mmol/L}\end{aligned}$$

例 3：细胞培养液上清样本用去离子水 2.5 倍稀释后取样 10 μ L，按说明书操作测得：空白孔 OD 值：0.2428，标准孔 OD 值：0.3918，测定孔 OD 值：0.3639，则计算结果为：

$$\begin{aligned}\text{细胞上清中钙含量（mmol/L）} &= \frac{0.3639 - 0.2428}{0.3918 - 0.2428} \times 1 \times 2.5 \\ &= 2.0319\text{mmol/L}\end{aligned}$$

(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，悬浮细胞直接转移后离心收集沉淀），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（ μ L）	10		
1mmol/L 钙标准液（ μ L）		10	
组织匀浆上清液（ μ L）			10
工作液 II（ μ L）	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：

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

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

$C_{\text{标准}}$ ：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； $V_{\text{样总}}$ ：样本匀浆时匀浆液总体积，L。

4、计算举例：

取 10%的大鼠脑组织匀浆上清液 10 μ L，按说明书操作测得：空白孔 OD 值：0.2428，标准孔 OD 值：0.3918，测定孔 OD 值：0.2689，并测得 10%大鼠脑组织蛋白浓度为 3.8475gprot/L,则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{组织中钙含量} &= \frac{0.2689 - 0.2428}{0.3918 - 0.2428} \times 1 \div 3.8475 \\ (\text{mmol/gprot}) &= 0.0455 \text{mmol/gprot} \end{aligned}$$

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(附送一块)。
- 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、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(有售蛋白定量试剂盒 BC016)。
- 5、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。
- 6、本试剂盒仅用于科研。

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。

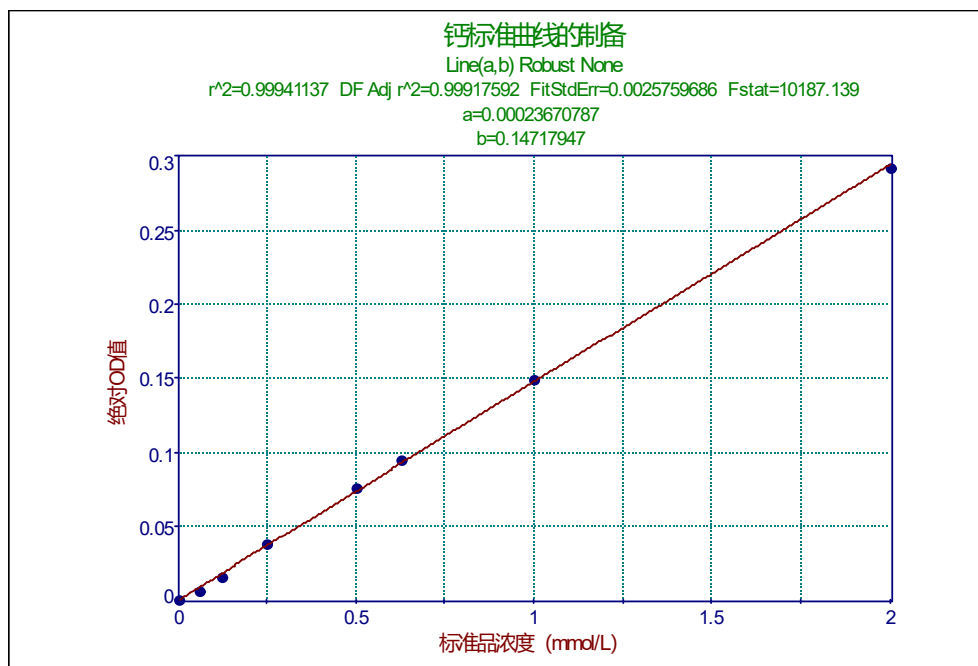
2、操作表：（工作液 II 操作表也可按上述标准浓度做标准曲线）

	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 (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。

