

# 钙测试盒说明书

(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, 测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液进行比较, 可计算出样本中钙的含量。

## 二、试剂组成与配制: (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
<b>1mmol/L 钙标准液</b> 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			
<b>工作液 I</b> 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)等液体样本用)			
<b>工作液 II</b> 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)			

注: 试剂三低温保存一段时间后会凝固, 用时只需将其 37℃加热融化即可。

## 三、样本要求:

- 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。
- 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)。

## 五、测定步骤:

### (一)、血清(浆)、细胞培养液等液体样本操作步骤:

#### 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
轻轻振荡孔板混匀, 静置 5 分钟, 波长 610nm, 酶标仪测各孔 OD 值 (A)。			

#### 2、计算公式:

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

$C_{\text{标准}}$ : 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, 弃去上清留细胞沉淀, 悬浮细胞直接转移后离心收集细胞沉淀), 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, 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
轻轻振荡孔板混匀, 静置 5 分钟, 波长 610nm, 酶标仪测各孔 OD 值 (A)。			

注: 加工作液 II 时注意不要加入气泡 (可以尝试用微量法加试剂), 否则读数时孔里的气泡会造成较大影响。

## 3、公式计算:

### (1) 组织或细胞样本按蛋白浓度计算:

$$\text{钙含量 (mmol/g 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

### (2) 组织样本按组织鲜重计算:

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

### (3) 细胞样本按细胞数计算:

$$\text{钙含量 (mmol/10}^4\text{ 细胞)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}}$$

$C_{\text{标准}}$ : 标准品浓度, 1mmol/L;

$C_{\text{pr}}$ : 匀浆蛋白浓度, g/L;

$W$ : 组织样本质量, g;

$\text{细胞数}$ : 细胞破碎前的总数量,  $10^4$  个;

$V_{\text{样总}}$ : 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:

- 实验器具应避免钙污染, 建议用一次性 96 孔板操作(附送一块)。
- 严重溶血、黄疸或脂血对结果有影响。
- 制备组织匀浆时, 应选去离子水作为匀浆介质, 避免钙污染。
- 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 A045-2 蛋白测定试剂盒 (考马斯亮蓝)、A045-3/4 蛋白测定试剂盒 (BCA 法))。
- 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。
- 本试剂盒仅用于科研。

## 附录 I：标准曲线计算法（参考）

## 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。

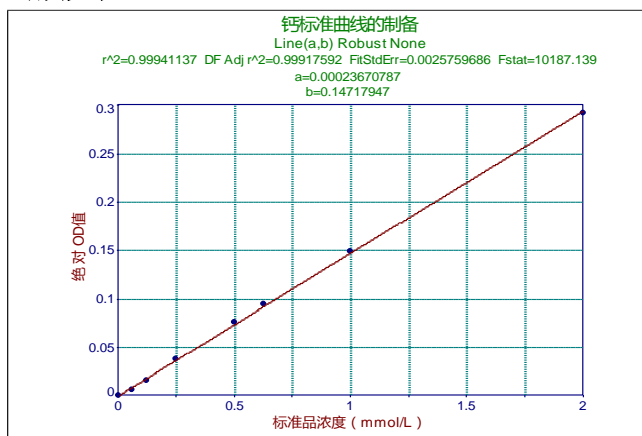
## 2、操作表：（工作液 II 操作表也可按上述标准浓度做标准曲线）

	空白孔	标准孔
去离子水（ $\mu\text{L}$ ）	10	
不同浓度的钙标准液（ $\mu\text{L}$ ）		10
工作液 I（ $\mu\text{L}$ ）	250	250
轻轻振荡孔板混匀，静置 5 分钟，波长 610nm，酶标仪测各孔 OD 值（A）。		

## 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：



- 5、样本用标曲计算时，可将样本测定绝对 OD 值代入标曲计算后得到的值，替换计算公式中的  $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$  项，其余项不变，继续运算可得结果。

注：标准曲线用户可以不，用计算公式计算即可。