**钙（Ca）测定试剂盒说明书（货号：PYB2053,规格:96T）**

1. **实验原理：**

 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。

1. **试剂组份**：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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） |

1. **使用步骤：**

 血清（浆）、细胞培养液

1. 操作表：

A测定-A空白

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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）= ×C标准×N

A标准-A空白

**C**标准：标准品浓度，1mmol/L；

**N**：样本测试前稀释倍数。

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。

1. 操作表：

A测定-A空白

计算公式： 钙含量（mmol/L）= ×C标准×÷Cpr

A测定-A空白

W

A测定-A空白

 钙含量（mmol/L） = ×C标准÷

V样总

A测定-A空白

**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。

所需仪器及试剂：

可调 610nm 波长的酶标仪，去离子水。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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 |

**四、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6.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））。

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。

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：

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

1. 测定结果：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准品浓度（mmol/L） | 测定 OD 值 | 绝对 OD 值 |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

作图如下: