

补体 C4 含量（免疫比浊法）检测试剂盒

（货号：ADS-W-D039-48 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

以免疫比浊法为测定原理，补体 C4 抗体与补体 C4 抗原引起抗原抗体反应，形成免疫复合物。在 340nm 波长处检测其浊度的变化，其变化程度与样本中的补体 C4 含量成正比。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
标准管	粉剂 1 支	4℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底； 2. 加 0.1ml 蒸馏水，一周内用完，配成的浓度见标签。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、天平、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 生理盐水，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：生理盐水体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样本：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

③ 血清，肝素或 EDTA 血浆也能作为样本被使用。样本中脂血≤5g/L、胆红素≤600μmol/L、溶血≤5g/L 时未观察到明显干扰

④ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：生理盐水(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于 25℃水浴条件下孵育 5-10 分钟，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管 （仅做一次）	标准管 （仅做一次）
----------	-----	---------------	---------------

样本	2		
蒸馏水		2	
标准品			2
试剂一	250	250	250
混匀, 37°C 孵育 5min 后, 于 340nm 处读取 A1。			
试剂二	50	50	50
混匀, 37°C 孵育 5min 后, 于 340nm 处读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。			

【注】：1.若 ΔA 值小于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由 2 μ L 增至 5 μ L, 空白管也由 2 μ L 增至 5 μ L 蒸馏水, 标准管仍然为 2 μ L+3 μ L 蒸馏水 (总体积同测定管和空白管即 5 μ L); 其他试剂均保持不变), 则改变后的 V1 代入公式重新计算。

2.若 ΔA 值大于 0.3, 可对样本用蒸馏水或生理盐水稀释后测定, 则稀释倍数 D 带入公式计算即可。

五、结果计算：

1、按组织质量计算：

$$\begin{aligned} \text{补体 C4 含量(mg/g)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{补体 C4 含量 (mg/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{补体 C4 含量(mg/ml)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V_1 \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D \end{aligned}$$

4 按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{补体 C4 含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度见标签；

V1---加入样本体积, 0.002mL；

V2---加入标准品体积, 0.002mL；

D--稀释倍数, 未稀释即为 1。

V---生理盐水体积, 1mL

W---样本取样质量, g

500---细菌/细胞数量, 万

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒