

## 补体 C4 含量（免疫比浊法）检测试剂盒

（货号：ADS-W-D039 微板法 96 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 25mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                                                         |
| 试剂二  | 液体 5mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                                                         |
| 标准管  | 粉剂 1 支      | 4℃保存 | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底；<br>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（10<sup>4</sup>）：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 | 标准管 |
|----------|-----|-----|-----|

|                                                            |     |        |        |
|------------------------------------------------------------|-----|--------|--------|
|                                                            |     | (仅做一次) | (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 $\Delta A$  值小于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由 2 $\mu$ L 增至 5 $\mu$ L, 空白管也由 2 $\mu$ L 增至 5 $\mu$ L 蒸馏水, 标准管仍然为 2 $\mu$ L+3 $\mu$ L 蒸馏水 (总体积同测定管和空白管即 5 $\mu$ 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 $\Delta A$  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:

$$\begin{aligned}\text{补体 C4 含量(mg/g)} &= (\text{C 标准} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D\end{aligned}$$

### 2、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned}\text{补体 C4 含量 (mg/mg prot)} &= (\text{C 标准} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V1 \div V \times \text{Cpr}) \times D \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

### 3、按照体积计算:

$$\begin{aligned}\text{补体 C4 含量(mg/ml)} &= (\text{C 标准} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V1 \times D \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D\end{aligned}$$

### 4 按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\text{补体 C4 含量(mg/10}^4\text{ cell)} &= (\text{C 标准} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times D\end{aligned}$$

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