

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K775-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(575-585 nm)

Elabscience®细胞铜(Cu^{2+})比色法测试盒(络合法)

Cell Copper (Cu^{2+}) Colorimetric Assay Kit

(Complexing Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞中铜离子含量。

检测原理

在酸性条件下，铜离子从铜蓝蛋白上解离下来，与络合剂反应，产生紫色络合物，在一定范围内吸光度值与浓度成正比。

本试剂盒检测细胞时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒 (货号 E-BC-K318-M) 进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	3.5 mL×1 瓶	7 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	5 μmol/L 铜离子标准品 (5 μmol/L Copper Standard)	5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	裂解液 (Lysis Buffer)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(575-585 nm)、37℃恒温箱、4℃离心机

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温，试剂一37℃孵育直至澄清。

② 试剂二工作液的配制：

临用前，取一支试剂二，加入0.25 mL双蒸水混匀，即为试剂二工作液，分装后-20℃保存一个月。

③ 显色剂工作液：

将试剂一：试剂二工作液按14：1的体积比混匀，现用现配。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	0.5	1	2	2.5	3	4	5
5 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	40	80	160	200	240	320	400
双蒸水(μL)	400	360	320	240	200	160	80	0

样本准备

① 样本处理

细胞样本：取收集好的细胞按约每 2×10^6 个细胞加入 0.2 mL 的试剂四裂解液，混匀后，放置在冰上裂解 10 min，然后 4°C ， $12000 \times g$ ，离心 10 min，取上清进行测定，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.18-5 $\mu\text{mol/L}$ ，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
293T 细胞	不稀释	Molt 细胞	不稀释
Jurkat 细胞	不稀释	Hela 细胞	不稀释

注：稀释液为双蒸水。

实验关键点

- ① 尽量选取新鲜的细胞样本进行实验。
- ② 在使用移液枪向酶标板中加入液体时避免气泡产生。
- ③ 在通风良好的地方操作。

操作步骤

① 标准孔：取 100 μL 8 个不同浓度的标准品，分别触底加入对应的标准孔中。

测定孔：取 100 μL 待测样本，触底加入测定孔中。

② 向步骤①中各孔加入 50 μL 显色剂工作液。

③ 盖上覆膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。

④ 酶标仪 580 nm，测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	100	--
待测样本(μL)	--	100
显色剂工作液(μL)	50	50
盖上覆膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min，酶标仪 580 nm，测各孔 OD 值。		

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

细胞中铜离子浓度计算公式:

$$\text{铜离子含量}(\mu\text{mol/gprot}) = (\Delta A_{580} - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔA_{580} : 样本测定 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为零时的 OD 值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 加入检测体系前样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

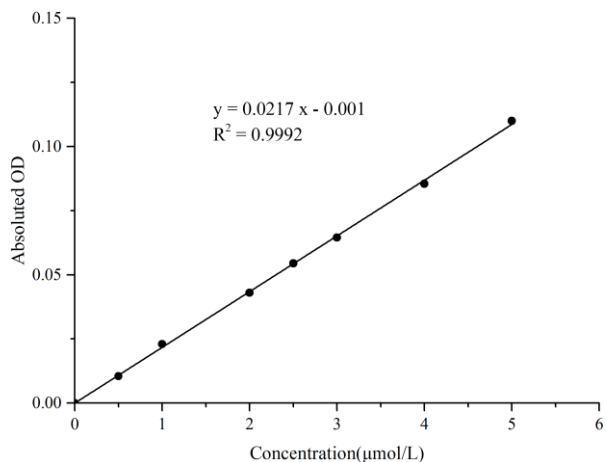
检测范围	0.18-5 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	3.1 %
灵敏度	0.18 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	3.0 %
平均回收率	105 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量100 μL ，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	0.5	1	2	2.5	3	4	5
测定 OD 值	0.048	0.059	0.072	0.091	0.103	0.112	0.134	0.157
	0.049	0.059	0.071	0.092	0.103	0.114	0.134	0.160
平均 OD 值	0.049	0.059	0.072	0.092	0.103	0.113	0.134	0.159
绝对 OD 值	0.000	0.011	0.023	0.043	0.055	0.065	0.086	0.110

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

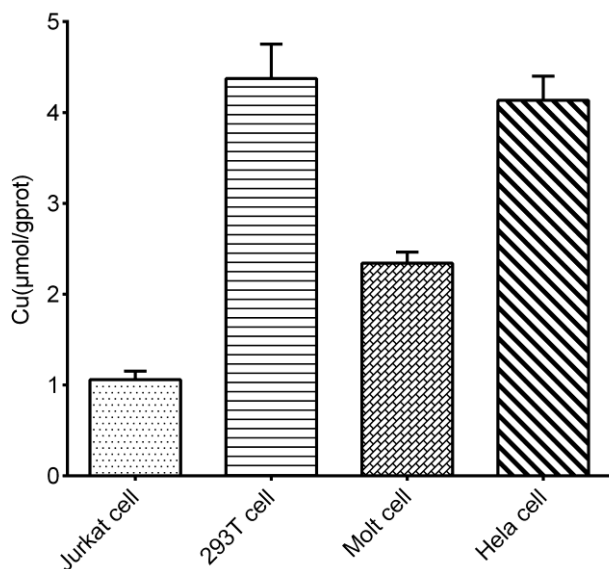
例如检测Molt细胞(数据仅供参考):

取 2×10^6 个Molt细胞加入0.2 mL试剂四裂解液, 经过样本处理后, 取100 μL 细胞匀浆上清按操作表进行检测, 其结果如下:

标准曲线: $y = 0.0217x - 0.001$, 测定孔平均OD值为0.086, 空白孔平均OD值为0.049, Molt细胞蛋白含量为0.70 gprot/L, 铜离子含量计算结果为:

$$\text{铜离子含量} = (0.086 - 0.049 + 0.001) \div 0.0217 \div 0.70 = 2.50 \mu\text{mol/gprot} \quad (\mu\text{mol/gprot})$$

按照说明书操作, Molt细胞(约 2×10^6 个细胞加入0.2 mL试剂四裂解液)、Jurkat\293T\Hela细胞(约 2×10^6 个细胞加入0.2 mL试剂四裂解液)中的铜离子含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
4. Carafa V, Russo R, Della Torre L, et al. The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 820. IF:4.848
5. Sun J, Leng P, Li X, et al. Salvianolic acid A promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes through regulation of the AMPK-PGC1 α signalling pathway. *Adipocyte*. 2022;11 (1):562-571. IF:3.553
6. Xu X, Cui Y, Li C, et al. SETD3 Downregulation Mediates PTEN Upregulation-Induced Ischemic Neuronal Death Through Suppression of Actin Polymerization and Mitochondrial Function. *Mol Neurobiol*. 2021; 58 (10):4906-4920. IF:3.464
7. Gao S, Li N, Chen R, et al. Bushen Huoxue Formula Modulates Autophagic Flux and Inhibits Apoptosis to Protect Nucleus Pulposus Cells by Restoring the AMPK/SIRT1 Pathway. *Biomed Res Int*. 2022; 2022:8929448. IF:3.047
8. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
9. Soebagjo H D, Fatmariyanti S, Paulus Sugianto N, et al. Detection of the Calcium and ATP Role in Apoptosis of Retinoblastoma Culture Cells through Caspase-3 Expression[J]. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2019, 12(03): 1307-1314.
10. Al-Ziaydi A G, Al-Shammari A M, Hamzah M I, et al. Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death[J]. *VirusDisease*, 2020: 1-8.

