

取扱説明書

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
 *下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。
<http://metallogenics.co.jp/>

銅を含むタンパク質の主な役割は酸化還元機能です。現在知られている、銅を含む酵素の殆どが分子状酸素と直接反応します。プラズマ中の銅のおよそ 95%は α -2-グロブリン、セロプラスミン、フェロキシダーゼ活性を持つ酸化酵素と結合しています。銅の欠乏に関連する病気として、心臓疾患、骨粗しょう症、骨関節炎、Menkes 症候群、ウイルソン病などがあります。また、生体内の抗酸化機能の低下についても報告されています。一方、過剰の銅は有毒となります。本キットは短時間 (約 10 分) で血清中の銅を精密に定量できる発色試薬です。

【測定原理】

本法は 3-5 DiBr-PAESA と銅とのキレート錯体形成による可視部の発色を観測し銅を求めるものです。セロプラスミン、及びタンパク質に結合した銅を、弱酸、変性剤により解離させ、銅-3-5 DiBr-PAESA 錯体を形成させます。この銅キレート錯体を波長 580nm で測定することにより銅濃度を求めることができます。

【キットの内容】

合計 100 測定分 (商品コード : CU03M)

R-A Buffer (緩衝液)	●	24 mL ×1
R-R Chelate Color (3,5-DiBr-PAESA) (キレート試液)	●	0.5 mL ×1
Copper Standard 200 μ g/dL (銅標準液)	●	1.2mL ×1

※ 商品コード : CU04M (合計 200 測定分) は、上記 CU03M が 2 包装含まれております。

【測定試料の注意点】

- 測定試料が強酸の場合は、pH 2 以上にしてからアッセイ検体として下さい。試料種によって pH 緩衝力が異なる場合があるため、pH を確認し、酸添加量の最適化を推奨しています。
- 懸濁や着色している試料を用いる場合は、主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した吸光度を用いて濃度を求めてください。
- 著しく懸濁している場合は遠心分離等で懸濁物を除去したものをアッセイ検体として下さい。
- 測定レンジ以上の検体は適当に希釈したものをアッセイ検体として下さい。または多点検量線から濃度を求めて下さい。
- 本法は、その得られる数値を保証するものではありません。予め特性を確認した後、応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。
- EDTA は測定値へ影響を与えるため使用しないで下さい。

【オペレーション】

1. 試薬の準備 (用事調製)

試薬を常温に戻し、以下の用量で発色液を調製して下さい。

発色液の調製 *発色液は調製後、当日中に使用して下さい。

測定検体数	1 検体あたり	(例) 50 検体
R-A 緩衝液	240 (μ L)	12(mL)
R-R Chelate Color (キレート試液)	5 (μ L)	0.25 (mL)

測定検体数に応じて必要量を用事調製

銅標準液

そのまま使用して下さい。

2. 試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照して下さい。

◇血清・血漿	そのままアッセイ検体として下さい (EDTA は添加しないでください)。
◇組織抽出液、ライセート、その他の試料	塩酸、硝酸等を試料 (RIPA, FBS, その他の水溶液) に添加し 0.01~0.1M 程度の酸試料とする。 (例 : 試料 1mL + 6M 塩酸 5~10 μ L) ↓ pH > 2 であることを確認しアッセイ検体とする。 (pH 範囲 : 2~7.0) *懸濁している場合は遠心分離による上清をアッセイ検体とする。

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて最適化して下さい。

***アッセイに適用できる検体は 2 < pH < 7 です。**

3. アッセイと測定操作

プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量（1 検体 252 μL 容量）

以下の用量で発色液、標準液、試料をウェルへ分注し、10 分後に下記の測定条件でマイクロプレートリーダー（紫外可視分光光度計）により測定してください。

○アッセイ

添加する試薬・試料 (μL)	アッセイ検体		
	試薬ブランク	銅標準試料	試料
精製水	12		
Copper Standard (銅標準液)		12	
試料			12
発色液	240	240	240
十分に混合し、室温 10 分後、所定波長の吸光度を測定			

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、攪拌では再現性不良が発生する場合があります。

*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。
但し 400 μg/dL 以上の試料では 2 倍～10 倍希釈したものをアッセイ検体としてください。
アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

測光波長（主波長）	580 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	570～590 nm
測定温度	25～37℃
ウェル	96 穴ウェル or 分光測定用セル等
*補正波長（副波長）	680～750 nm

○濃度の算出

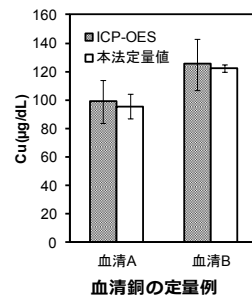
$$\frac{OD_{\text{試料}} - OD_{\text{ブランク}}}{OD_{\text{標準}} - OD_{\text{ブランク}}} \times 200 = \text{銅濃度}(\mu\text{g/dL})$$

標準液濃度

OD_{試料} : 試料の吸光度
 OD_{標準} : 標準試料の吸光度
 OD_{ブランク} : 試薬ブランクの吸光度
 *単位換算 μg/dL × 0.157 = μmol/L

○計算例

アッセイ検体	OD	ΔOD	算出濃度 μg/dL
試薬ブランク	0.071	-	
200μg/dL銅標準液	0.161	0.09	
血清試料A	0.114	0.043	95.6
血清試料B	0.126	0.055	122



【主な仕様と性能】

感度	試薬をブランクとして銅標準液 (200 μg/dL) を測定した時の ΔOD は 0.05～0.15 の範囲内です。
同時再現性	同一検体を 5 回測定した時の CV は 5% 以内です。
正確性	既知濃度の血清標準物質における表示値との差は 10% 以内です。
測定範囲	3～400 μg/dL
共存物質の参考許容範囲	抱合型ビリルビン・非抱合型ビリルビン 40 mg/dL ヘモグロビン 0.1 g/dL 乳び 500FTU

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）

開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

【参考文献】

Abe, A., Yamashita, S., Noma, A., (1989) *Clin. Chem.*, 552-554.

Makino T., Kiyonega. *Clin. Chem. Acta*, 171,19 (1988)

【製造販売業者】

メタロジェニクス 株式会社 千葉県中央区富士見 1-14-13 千葉大栄ビル

*メタロアッセイ™ は、メタロジェニクス (株) の 試薬キットの名称です。

問い合わせ先

メタロジェニクス株式会社 営業部

〒260-0015 千葉県中央区富士見 1-14-13 千葉大栄ビル

TEL : 043-227-6767

FAX : 043-227-6768

e-mail : sales@ak-j.com

URL : <http://metallogenics.co.jp/>

* 取扱説明書、測定プロトコル等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。

<http://metallogenics.co.jp/>

* 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承下さい。

* 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。

* 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No. を御確認の上、お問い合わせ下さい。

* 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコルは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。

* 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート (MSDS) に従って下さい。