

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ください。
 *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/>

【測定原理】

本キットの発色試剤である 3,5-DiBr-PAESA は銅イオンと結合すると、銅キレート錯体を生成し、赤色から紫色に色調が変化します⁽⁴⁾。この発色レベルにより、尿中の銅濃度を求めることができます。簡便に目視で検出する場合は標準液の色調と比較し、その濃度を判定します。

【尿中銅定量の意義】

銅は金属運搬タンパク質であるセルロプラスミンや活性酸素の除去酵素である SOD の構成元素として生体内で欠かすことのできない必須微量元素である。経口摂取された銅は小腸で吸収され、血清中ではそのほとんどがセルロプラスミン結合型である。銅過剰症疾患の代表は Wilson 病で染色体劣性遺伝により銅輸送タンパク (ATPase) が欠損している⁽⁴⁾。従って、肝細胞内の銅が過剰に蓄積され、血中非セルロプラスミン銅が増加、錐体外路症状 (知能障害)、腎障害、二次性 Fanconi 症候群、Kayser-Fleisher 角膜輪、セルロプラスミン合成阻害による血清銅の低下、一方で肝細胞壊死による劇症肝炎、肝不全、溶血発作、肝炎を経て肝硬変へ至る。その発症は肝から胆汁中への銅排泄障害が主因であり、肝、大脳基底部、角膜、腎などに過剰な銅沈着を生じ、上述以外にも全身諸臓器障害を呈することが明らかになっている。銅キレート薬を投与後に尿中銅が高値であった場合は Wilson 病が疑われる^(2,3)。

【キットの内容】

合計 100 測定分 (商品コード CU20M)

| | | |
|---------------------------------|---|---------|
| R-A Buffer (緩衝液) | ● | 14 mL×1 |
| R-R Chelate Color (キレート試液) | ● | 0.5mL×1 |
| Copper Standard 80 µg/dL (銅標準液) | ● | 10 mL×1 |

※商品コード CU21M (合計 200 測定分) は、上記 CU20M が 2 包装含まれております。

【測定試料の注意点】

- 本キットでは血清試料は適用できません。血清銅を定量する場合は弊社姉妹品の「メタロアッセイ 銅測定 LS」をご使用ください。
- 本キットは、尿試料へ最適化されています。その他の試料 (細胞抽出液、組織抽出液等) を検体とする場合は、検体中のターゲット濃度が測定レンジ内であることを確認し、標準液の濃度、及び測定パラメータを最適化されることをお奨め致します。
- 本キットは全血を検体として用いることはできません。
- 尿を検体とする場合、懸濁していると誤差の原因となります。懸濁していない新鮮なものを使用してください。
- 検体に EDTA 等の他のキレート剤を添加しないでください。

【オペレーション】

1. 試薬の準備 (用事調製)

以下の用量で R-A、R-R、銅標準液を清澄な容器に分注し、**標準液**を調製して下さい。また、目的別に発色試液を用事調製して下さい。

銅標準液の調製 (試験 1 回分)

以下の用量で 80 µg/dL 銅標準液を希釈し、目的別に標準液を調製して下さい。

| | A.目視判定の場合 | B.プレートリーダーによる定量の場合 |
|---------------------------------|---------------|--------------------|
| Copper Standard 80 µg/dL (銅標準液) | 25 (µL) | 50 (µL) |
| 精製水 | 75 (µL) | 50 (µL) |
| 20 µg/dL 銅標準液 | 40 µg/dL 銅標準液 | |
| 100 µL とする | 100 µL とする | |

目視検出法、及び通常アッセイ法

(着色が濃厚な試料の場合は、検体ブランク補正法を適用して下さい。>P3 参照)

発色試液の調製 *発色試液は調製後、すぐに使用して下さい。

| | 測定検体数 | 1 検体あたり | (例) 100 検体 |
|----------------------------|----------|----------|------------|
| R-A Buffer (緩衝液) | 140 (µL) | 14 (mL) | |
| R-R Chelate Color (キレート試液) | 5 (µL) | 0.5 (mL) | |

測定検体数に応じて必要量を用事調製

2. 試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照して下さい。

| |
|---|
| ◇尿試料 そのままアッセイ検体として下さい。 |
| ◇組織抽出液、ライセート、その他の試料 塩酸、硝酸等を試料に添加し 0.01M 程度の酸試料とする。 (例: 試料 1mL + 6M 塩酸 10µL) pH 試験紙により検体が pH 2-3 程度であることを確認する。 ↓ アッセイ検体とする。 *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 pH > 2 です。pH < 1 の検体であるとアッセイ時に懸濁が生じたり、感度に誤差が生じます。

2. アッセイと測定操作

A. 目視判定の場合(1 検体 240 μL 容量)

用事調製された発色試液、銅標準液 (20, 80 μg/dL)、試料を以下の用量で試験管、ウエル等の清浄な容器に分注して下さい。

○アッセイ

| 添加する試薬・試料 (μL) | アッセイ検体(240 μL) | | | |
|-----------------|----------------|--------|--------|-----|
| | 試薬ブランク | 低値標準試料 | 高値標準試料 | 試料 |
| 精製水 | 100 | - | - | - |
| 20 μg/dL 銅標準液* | - | 100 | - | - |
| 80 μg/dL 銅標準液** | - | - | 100 | - |
| 試料 | - | - | - | 100 |
| 発色試液 | 140 | 140 | 140 | 140 |

十分に混合し、室温 10 分後における試料と標準試料 (低値、高値) との色調を比較

*標準液はカットオフ値、目的に合わせて、任意の濃度で調製してください。
但し 80μg/dL 以上では色調が一定になるため、試料を 2 倍～10 倍希釈してアッセイしてください。

*用事調製された銅標準液 **キット添付の銅標準液
アッセイボリュームを変更する場合は上記用量と同じ割合で操作して下さい。

B. プレートリーダー (紫外可視分光光度計) による定量の場合

用事調製された発色試液、銅標準液(40 μg/dL)、試料を以下の用量でウエル、セル等の清浄な容器に分注して下さい。

○アッセイ(1 検体 240 μL 容量)

| 添加する試薬・試料 (μL) | アッセイ検体 | | |
|----------------|--------|------|-----|
| | 試薬ブランク | 標準試料 | 試料 |
| 精製水 | 100 | - | - |
| 40 μg/dL 銅標準液 | - | 100 | - |
| 試料 | - | - | 100 |
| 発色試液 | 140 | 140 | 140 |

十分に混合し、室温 10 分後、所定波長の吸光度を測定

*ピペ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 80μg/dL 以上では色調が一定になるため、試料を 2 倍～10 倍希釈してアッセイしてください。
アッセイボリュームを変更する場合は上記用量と同じ割合で操作して下さい。

測定条件 (マイクロプレートリーダー)

| | |
|-------------|---------------------|
| 測光波長 (主波長) | 582 nm (吸収極大波長) |
| 感度のある波長域 | 570～590 nm |
| 測定温度 | 25～37℃ |
| ウエル | 96 穴ウエル or 分光測定用セル等 |
| *補正波長 (副波長) | 650～700 nm |

*紫外可視分光光度計を使用してキュベットで測定する場合、測定可能な検体数はマイクロプレートリーダー使用時と比較して少なくなります。ダウンサイズされた微量セルを使用することで 96 穴ウエルと同等の測定数を得ることも可能です。詳細については、弊社 website のサポート情報「紫外可視分光計 微量セル推奨品」を御参照下さい。微量セルはセルホルダーとのクリアランスの僅差による誤差、再現性の低下などが報告されています。使用時にはセルホルダーへ均一に装着されていることを十分に確認してください。

*濁りが著しい試料の場合、主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した値を OD 値として濃度を算出することで、より一層の正確性を付与させることができます。

*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用して下さい。

○濃度の算出

$$\frac{OD_{\text{試料}} - OD_{\text{ブランク}}}{OD_{\text{標準}} - OD_{\text{ブランク}}} \times 40 = \text{銅濃度}(\mu\text{g/dL})$$

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 × 0.1573 = μmol/L

アッセイの応用

着色が著しい検体を使用する場合

○検体ブランク補正法(1 検体 245 μL 容量、マイクロプレートリーダー使用の場合)

| 添加順と添加試薬 (μL) | アッセイ検体 | | |
|---------------------------------|--------|------|-----|
| | 試薬ブランク | 標準試料 | 試料 |
| 精製水 or 生理食塩水 | 100 | - | - |
| 40μg/dL 銅標準液 | - | 100 | - |
| 試料 | - | - | 100 |
| R-A 緩衝液 | 140 | 140 | 140 |
| ↓ | | | |
| 十分に混合し 5 分間静置後、所定波長の吸光度 OD1 を測定 | | | |
| ↓ | | | |
| R-R Chelate color (発色試液) | 5 | 5 | 5 |
| ↓ | | | |
| 十分に混合し 5 分間静置後、所定波長の吸光度 OD2 を測定 | | | |

*紫外可視分光光度計使用の場合は体積補正が必要です。

○濃度の算出 (検体ブランク補正法)

$$\frac{OD2_{\text{試料}} - OD1_{\text{試料}}}{OD2_{\text{標準}} - OD1_{\text{標準}}} \times 40 = \text{銅濃度}(\mu\text{g/dL})$$

標準濃度

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 $\mu\text{g/dL} \times 0.1573 = \text{mmol/L}$

・濃度の算出例：(96 ウェルリーダー)

| アッセイ検体 | OD1 | OD2 | ΔOD (OD2-OD1) | ΔOD各試料-ΔOD試薬ブランク | 算出濃度 μg/dL |
|-------------|-------|-------|------------------|------------------|---------------|
| 試薬ブランク | 0.026 | 0.080 | 0.054 | 0.000 | - |
| 40μg/dL銅標準液 | 0.028 | 0.208 | 0.180 | 0.126 | - |
| 既知濃度尿試料A | 0.028 | 0.092 | 0.064 | 0.010 | 3.2 |
| 既知濃度尿試料B | 0.029 | 0.088 | 0.059 | 0.005 | 1.6 |

【主な仕様と性能】

| | |
|-------------|--|
| 感度 | 試薬をブランクとして銅標準液 (80 μg/dL) を測定した時のΔODは0.1~0.5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 | 目視判定の場合、既知濃度試料との検出誤差は25%以内です。 紫外可視分光光度法による既知濃度試料との誤差は25%以内です。 (銅濃度 20-40 μg/dL の尿試料の測定時) |
| 測定範囲 | 目視判定 10~80 μg/dL 汎用型マイクロプレートリーダーによる定量 2~80 μg/dL (D.L=1.0 μg/dL) 通常 5 μg/dL 以上の検体を推奨 |
| 共存物質の参考許容範囲 | 100 μg/dL の Fe、Zn による測定値への影響は5%以内です。 |

【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】

- 1) Wilson S. A. K., Brain, 34, 295-309 (1912).
- 2) Osman M. A., Patel R. B., Schuna A., Sundstrom W. R., Welling P.G., Clin. Pharmacol. Ther., 33, 465-470 (1983).
- 3) Taira K., Takagawa K., Okawa M., Yoshida H., Jpn. J. Pediatr. Med., 29, 139-144(1997).
- 4) A. Abe et al, Clin. Chem., 35 (4), 552 (1989)

【製造販売業者】

メタロジェニクス 株式会社 千葉市中央区亥鼻 1-8-15 千葉大亥鼻イノベーションプラザ
 ※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
 〒260-0856 千葉市中央区亥鼻 1-8-15 千葉大亥鼻イノベーションプラザ
 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。