

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】

本法は 5-Br-PAPS と亜鉛とのキレート錯体形成による可視部の発色を観測し、亜鉛濃度を求めるものです。5-Br-PAPS は Zn<sup>2+</sup> と安定なキレート錯体を生じます。このキレート錯体における波長 560 nm 付近の吸光度を測定し亜鉛濃度を求めます。唾液の酸抽出試料中の亜鉛や、50µg/dL 以下の低濃度亜鉛含有試料の定量へ応用することができます。

【亜鉛定量の意義】

亜鉛は 200 種類を超える金属酵素を構成しており、核酸、タンパク質の合成に関わる元素です。特に細胞の複製には不可欠であり、哺乳類においては成長期の急性的な亜鉛欠乏により、皮膚や毛髪の障害、発育遅延などが報告されています。従って、亜鉛の適切な供給は身体の健全な発達に重要です。医学、栄養学的研究において、近年、一層注目されている微量元素です。

【キットの内容】

合計 100 測定分 (商品コード ZN10M)

Chelate Color (発色液)	●	20 mL×1
Zinc Standard 50 µg/dL (亜鉛標準液)	●	4 mL×1

※ 商品コード ZN11M (合計 200 測定分) は、上記 ZN10M 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ください。試料種によって pH 緩衝力が異なる場合があるので pH を確認し、酸の添加量を最適化して下さい。
- 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ください。
- 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ください。または多点検量線から濃度を求めて下さい。
- 血清亜鉛の直接定量には使用できません。血清亜鉛を直接定量する場合は、弊社姉妹品のメタロアッセイ 亜鉛測定 LS を御使用下さい。詳細については、弊社 website を御参照下さい。
- 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。

【オペレーション】

1. 試薬の準備

Chelate Color (発色液): そのまま使用して下さい。  
Zinc Standard (亜鉛標準液): そのまま使用して下さい。

\*発色液は冷暗所 (2-8°C) に保存し、開封後は 3ヶ月以内に使用して下さい。  
\*ゴム製蓋、パッキン、セプトラムラバー等からの亜鉛のコンタミネーションの可能性が報告されています。使用器具は汚染されていないものを使用し、コンタミネーションには十分に注意してください。

2. 試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照してください。

◇ 遊離亜鉛を定量する場合 (タンパク結合解離型、遊離イオン型)
① 採取された試料に塩酸または硝酸を添加、0.01~0.06M 程度の酸溶液とする。 (例: 試料 1mL に 6M 塩酸 10µL 添加)
↓
② 10~20 分揺動攪拌 (or 数回ボルテックス)、亜鉛を解離させる。
↓
③ 4~8°C, 5000~12,000 rpm で遠心分離し夾雑タンパク質を沈殿させる。
↓
④ 上清を採取しアッセイ検体とする。
◇ 有機亜鉛を含む全亜鉛を定量する場合
① 混酸、灰化、マイクロウェーブ分解
↓
② 試料を水酸化ナトリウム等で中和し、pH2 以上とする。
↓
③ 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。

### 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 240 μL 容量）

発色液、亜鉛標準液、試料を以下の用量でウェル、セ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		
	試薬ブランク	亜鉛標準試料	試料
Chelate Color（発色液）	200	200	200
精製水	40		
Zinc Standard（亜鉛標準液）		40	
試料			40

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 60μg/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）	560 nm（吸収極大波長）
感度のある波長域	550～580 nm 感度： 560nm 極大, 570nm 60%, 580nm 20%
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）	690～750 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 穴ウェ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。

\*懸濁試料の場合、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ェルを使用してください。

#### ○濃度の算出

$$\frac{OD_{\text{試料}} - OD_{\text{ブランク}}}{OD_{\text{標準}} - OD_{\text{ブランク}}} \times 50 = \text{亜鉛濃度}(\mu\text{g/dL})$$

標準液濃度

OD<sub>試料</sub> : 試料の吸光度  
OD<sub>標準</sub> : 標準試料の吸光度  
OD<sub>ブランク</sub> : 試薬ブランクの吸光度

#### 【主な仕様と性能】

感度	試薬をブランクとして亜鉛標準液 (50 μg/dL) を測定した時の $\angle$ OD は 0.1～0.3 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	ICP-MS 法との誤差は 15% 以内です（亜鉛濃度が 20 μg/dL の Saliva 試料測定時）。
測定範囲	1～60 μg/dL
共存物質の参考許容範囲	アルカリ土類金属：1000 倍量（モル濃度）のときデータへの影響は 5% 以内です。 遷移金属：10 倍量（モル濃度）のときデータへの影響は 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】

Makino, T., Saito, M., Horiguchi, D. and Kina, K. *Clin. Chim. Acta*, 120, 127-135 (1982)

#### 【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。弊社 website に掲載している最新の情報に従い、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。