

细胞铜（Cu）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC17973

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 17 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 试剂一：若有试剂析出，置于37°C水浴溶解即可。
2. 标准品：10mmol/L（即10000nmol/mL）硫酸铜标准液。
3. 20nmol/mL标准品配制：将10000nmol/mL标准液用蒸馏水先稀释为200nmol/mL的标准溶液，再将200nmol/mL标准液稀释为20nmol/mL的标准液备用，具体稀释可参考以下：取20 μ L 10000nmol/mL的标准液加入980 μ L蒸馏水混匀，即为200nmol/mL的标准品；再吸取100 μ L 200nmol/mL的标准液加入900 μ L蒸馏水混匀，即为20nmol/mL的标准品。

产品说明：

铜（Cu）是人体必需的微量元素之一，也是蛋白质以及酶的重要组成部分。可以存在于红细胞的内外，主要功能是辅助造血，即催化血红蛋白的合成。铜元素可以适当促进人体的骨骼发育，促进人体神经系统以及脑部发育，维持婴幼儿的正常生长发育，因此，测定细胞内铜离子含量可知体内是否缺铜。

在酸性条件下，Cu²⁺从铜蓝蛋白和清蛋白中解离出来，与络合剂3,5-二溴-PAESA反应，产生紫色络合物，在580nm处有特征吸收峰，在一定范围内吸光度与浓度成正比，从而计算出Cu²⁺浓度。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

细胞的处理：收集细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细胞数量（10⁶ 个）：蒸馏水体积（mL）为 5~10:0.4 的比例（建议 5 百万细胞加入 0.4mL 蒸馏水），超声波破碎细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 7s，共 3min），然后 10000g，4°C，离心 10min，取上清置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至580nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、实验前根据样本量取部分试剂一37°C预热10min。

3、操作表：（在1.5mLEP管或96孔板中加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	50	-	-
样本	-	50	-
标准品	-	-	50
试剂一	110	110	110
试剂二	50	50	50

充分混匀，37°C孵育5min，取反应液于微量玻璃比色皿/96孔板中，立即测定580nm处吸光值A，记为A空白、A测定、A标准，计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准管只需测1-2次。

三、细胞铜（Cu）含量的计算

1. 按细胞数量计算

$$\text{细胞铜 (Cu) 含量 (nmol/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{提取}} \div N = 8 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

2. 按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{细胞铜 (Cu) 含量 (nmol/mg prot)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \\ &= 20 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

C标准：标准品浓度，20nmol/mL；V提取：前处理中蒸馏水体积，0.4mL；N：细胞总数，以百万计；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

注意事项：

- 37°C孵育 5min 后请立即测定吸光度，若样本数量过多，可分批次测定，尽量确保在 20min 内完成测定。
- 如果样本测定吸光值大于 0.5，建议将样本用蒸馏水稀释后进行测定，注意同步修改计算公式。
- 如果样本测定吸光值小于 0.005 或接近空白管吸光值，可适当增大样本量，空白管和标准管也需要进行相应调整。

实验实例：

- 收集约 5 百万 SHSY5Y 细胞，加入 0.4mL 蒸馏水，超声波破碎（功率 200w，超声 3s，间隔 7s，共 3min），10000g，4°C离心 10min，取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}=0.152-0.092=0.060$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}=0.334-0.092=0.242$ ，按细胞数量计算铜含量得：
细胞铜含量 (nmol/10⁶ cell) = $8 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N = 0.3967 \text{ nmol/10}^6 \text{ cell}$ 。
- 收集约 5 百万 U937 细胞，加入 0.4mL 蒸馏水，超声波破碎（功率 200w，超声 3s，间隔 7s，共 3min），10000g，4°C离心 10min，取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}=0.122-0.092=0.030$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}=0.334-0.092=0.242$ ，按细胞数量计算铜含量得：
细胞铜含量 (nmol/10⁶ cell) = $8 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N = 0.1983 \text{ nmol/10}^6 \text{ cell}$ 。

相关系列产品：

- AC10349/AC10350 血清铁浓度检测试剂盒
- AC17860/AC17861 亚铁离子含量检测试剂盒
- AC17828/AC17803 组织铜（Cu）含量检测试剂盒
- AC17948/AC17953 血清铜（Cu）含量检测试剂盒