

LabAssay™ Ammonia

Please, read this instruction carefully before use.

1. Introduction

Ammonia is converted to urea in the urea cycle and excreted in the urine.

LabAssay™ Ammonia is the reagent kit for assay of ammonia based on a colorimetric method using the Berthelot reaction. This kit is used for the quantitative determination of ammonia in mouse, rat and human blood. It is a simultaneous multi-sample assay format using a microplate, but measurements can also be made using a test tube.

2. Kit Contents

	Components	State	Amount
(1)	Deproteinizing Reagent	liquid	100 mL/1 bottle
(2)	Chromogen Reagent A	liquid	50 mL/1 bottle
(3)	Chromogen Reagent B	liquid	25 mL/1 bottle
(4)	Chromogen Reagent C	liquid	50 mL/1 bottle
(5)	Standard Solution	liquid	15 mL/1 bottle
(6)	Dilute Solution For Standard	liquid	20 mL/1 bottle

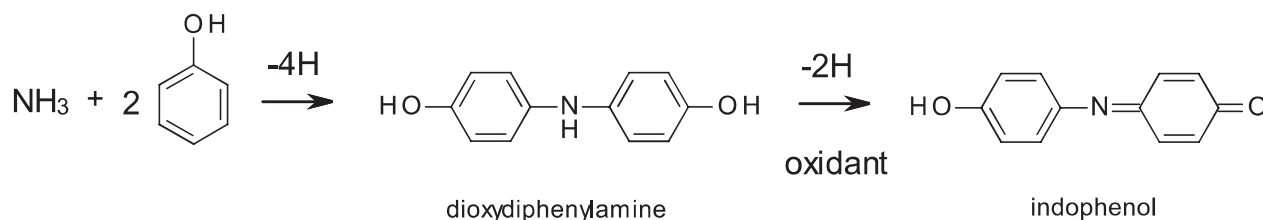
※ Assay in a microplate format ; 700 tests. Assay in a test tube format ; 60 tests.

3. Storage and Expiration

When the complete kit is stored at 2°C - 10°C, the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container.

4. Assay Principle

The Deproteinizing Reagent deactivates the enzymes and removes the components that inhibit color reaction in a sample. After adding Deproteinizing Reagent to a sample and centrifuging, add Phenol, Sodium Pentacyanonitrosylferrate (III) Dihydrate, and Sodium Hypochlorite to the supernatant. The indophenol blue pigment is obtained by the following schematic reaction. The amount of ammonia contained in the sample is determined by measuring the absorbance of the blue color.



※ Sodium pentacyanonitrosylferrate (III) dihydrate acts as catalyst

5. Materials and Apparatuses to be prepared

(For Microplate method)

- 96 wells microplate (transparent type) ·Micropipette ·Incubator maintaining at 37°C *
- Plate mixer *
- Microplate reader with a 630 nm wavelength filter (* if the microplate reader is not equipped.)

(For Test Tube method)

- Test tube or microtube ·Pipette ·Incubator maintaining at 37°C
- Spectrophotometer with a 630 nm wavelength filter

6. Preparation of Reagents to be used

Before the measurement, transfer the required reagents to the tubes and adjust the reagents to the following temperatures.

- Return Ammonia Standard Solution, Deproteinizing Reagent, and Dilute Solution for Standard to room temperature *.
- Incubate Chromogen Reagent A, B, and C at 37°C for an hour.

* Room temperature : 20°C - 25°C

(1) Standard Solution (Microplate method)

Standard Solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Standard	Dilute Solution For Standard	Concentration
1	50 μ L	150 μ L	100 μ g/dL
2	100 μ L	100 μ L	200 μ g/dL
3	150 μ L	50 μ L	300 μ g/dL
4	undiluted	—	400 μ g/dL

(2) Standard Solution (Test Tube method)

Standard Solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Standard	Dilute Solution For Standard	Concentration
1	200 μ L	600 μ L	100 μ g/dL
2	400 μ L	400 μ L	200 μ g/dL
3	600 μ L	200 μ L	300 μ g/dL
4	undiluted	—	400 μ g/dL

7. Preparation of Samples

- Ammonia in whole blood increases at room temperature. Therefore, collect the blood and transfer to test tubes or microtubes containing Deproteinizing Reagent and centrifuge the samples to separate supernatant as quickly as possible.
- Store the supernatant on ice or at 2°C - 10°C and measure the sample within an hour.
- Do not use anticoagulants such as heparin and double oxalate.
- Amino acid preparations can cause a slightly negative effect on the assay.
- Amino acids in the blood may affect the assay.

8. Procedure

Before the measurement, transfer the required reagents to the tubes and adjust the reagents to the following temperatures.

- Return Standard Solution, Deproteinizing Reagent and Dilute Solution For Standard to room temperature*.
- Incubate Chromogen Reagent A, B and C at 37°C for an hour.

* Room temperature : 20°C - 25°C

(1) Assay in a Microplate format

Perform the assay in the wells according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
An experiment can be conducted in a microtube			
Deproteinizing Reagent	Deproteinizing reagent : Sample = 4 : 1 (v/v)	Deproteinizing reagent : Standard solution = 4 : 1 (v/v)	70 μ L
Sample			—
	Mix well. Centrifuge at 5000 \times g, 4°C, for 15 min. Subsequent operations should be performed in the wells	Mix well. Subsequent operations should be performed in the wells.	
	Supernatant 70 μ L	Mixed solution 70 μ L	—
Chromogen Reagent A	70 μ L	70 μ L	70 μ L
Chromogen Reagent B	35 μ L	35 μ L	35 μ L
Chromogen Reagent C	70 μ L	70 μ L	70 μ L
After adding each reagent to a microplate, mix well and incubate at 37°C, for 20 min. Mix well, then stand for 30 min at room temperature*.			
Mix well, then measure the absorbance of the test sample and standard solution at 630 nm with the blank as the control.			

* Room temperature : 20°C - 25°C

(2) Assay in a Test Tube

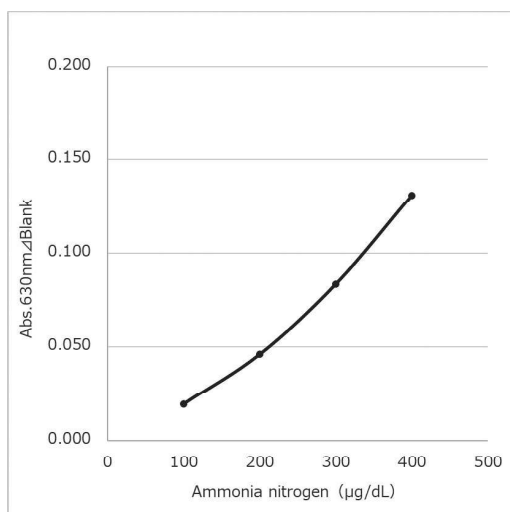
Perform the assay in the tubes according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Operations should be performed in the microtubes.			
Deproteinizing Reagent	Deproteinizing reagent : Sample = 4 : 1 (v/v)	Deproteinizing reagent : Standard solution = 4 : 1 (v/v)	800 μ L
Sample			—
	Mix well. Centrifuge at 5000 \times g, 4°C, for 15 min.	Mix well.	
	Transfer the supernatant (800 μ L) to a new tube.	Transfer mixed solution (800 μ L) to a new tube.	—
Chromogen Reagent A	800 μ L	800 μ L	800 μ L
Chromogen Reagent B	400 μ L	400 μ L	400 μ L
Chromogen Reagent C	800 μ L	800 μ L	800 μ L
After adding each reagent to a tube, mix well and incubate at 37°C, for 20 min. Mix well, and place in water to cool (20°C - 25°C) for 30 min. Mix well, then measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Spectrophotometer : 630 nm.			

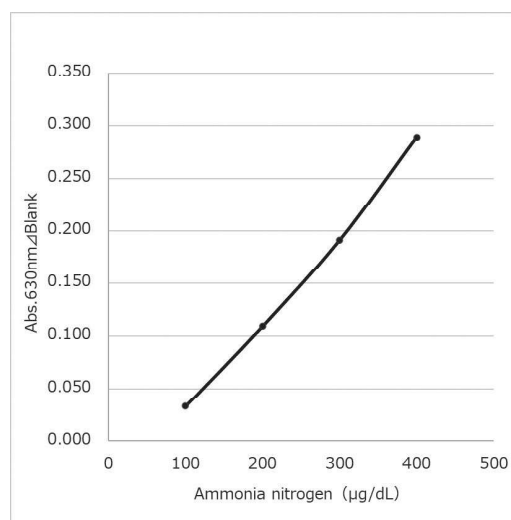
※ Assay in a test tube ; 60 tests.

9. Standard Curve

[Assay in a microplate]



[Assay in a test tube]



10. Performance

(1) Sensitivity [assay in a test tube method]

- The absorbance is 0.010 to 0.070, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.200 to 0.370, when measuring 400 μ g/dL ammonia as a sample.

(2) Specificity

The ammonia concentration is less than $\pm 35\%$, when measuring the known concentration of control blood as a sample.

11. Usage Notes

(1) Notes on the assay

- Do not use the reagents described above in any procedures other than those described herein. Performance cannot be guaranteed if the reagents are used in other procedures or for other purposes.
- Operate the measurement apparatuses according to operator's manuals under appropriate conditions. Consult the apparatus manufacturer for details.
- Keep the provided reagents under the indicated conditions before the expiration.
- Do not use reagents, which were frozen in error. Such reagents may give false results.
- After opening the reagents, it is recommended to use them immediately. The opened vials should be capped and kept

under the specified conditions.

- Do not use the containers and other materials in the package for any purpose other than those described herein.
- Reagents which are kept open for a long time cause dispersion of the measured values by absorbing ammonia. The opened vials should be capped and store at 2°C - 10°C.
- Avoid exposing reagents to direct sunlight during operation.
- Do not use the reagents at other reaction temperatures and reaction times other than described herein.
- Wash the equipment with a weak alkaline solution. Wash them with tap water. Rinse them well with deionized water. Tap water and distilled water may contain a lot of volatile ammonium salts. Pay attention to washing of experimental instruments.
- When collecting the supernatant after centrifuging, pay attention not to mix with suspended matter. Suspended matter may cause dispersion of the measured values.
- This kit is for research use only. Not for use in diagnostic procedure.

(2) Safety Precautions

- If reagents come into contact with the mouth, eyes, or skin, immediately wash with a lot of water. Consult with a physician if necessary.
- Deproteinizing Reagent is an acid solution which is less than pH 3.
- Chromogen Reagent B and C are alkaline solutions which are more than pH 11.
- A pipette with a safety pipette filter should be used.

(3) Waste

- The waste should be processed appropriately according to the laws and regulations.
- Chromogen Reagent A contains 0.015% Sodium Pentacyanonitrosylferrate (III) Dihydrate and 40 g/L Phenol.
- All the devices including, reagents and vials, that come into contact with the specimen should be considered potentially infectious.

LabAssay™ Ammonia

[Storage]	Store at 2°C - 10°C (Do not freeze)
[Expiration date]	Indicated on the label
[Package]	For 700 tests
[Cat #]	297-94601

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : +81-6-6203-3741
Facsimile : +81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bollwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : +1-804-271-7677
Facsimile : +1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : +49-2131-311-0
Facsimile : +49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

ラボアッセイ™ アンモニア

1. はじめに

生体内で産生されたアンモニアは、肝臓の尿素サイクルによって尿素に変換され尿中に排泄されます。

本品は、ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウムを触媒として、フェノール、次亜塩素酸を用いたベルテロー反応を利用した比色法に基づくアンモニア測定試薬です。マウス、ラットおよびヒト血液中のアンモニア量の測定に用いることができます。マイクロプレート法および用手法での測定が可能です。体外診断用に用いることはできません。

2. キット構成試薬

	構成試薬	状態	容量
(1)	Deproteinizing Reagent 除たん白試液	溶液	100mL/1本
(2)	Chromogen Reagent A 発色試液 A	溶液	50mL/1本
(3)	Chromogen Reagent B 発色試液 B	溶液	25mL/1本
(4)	Chromogen Reagent C 発色試液 C	溶液	50mL/1本
(5)	Standard Solution 標準品	溶液	15mL/1本
(6)	Dilute Solution For Standard 標準品用希釈液	溶液	20mL/1本

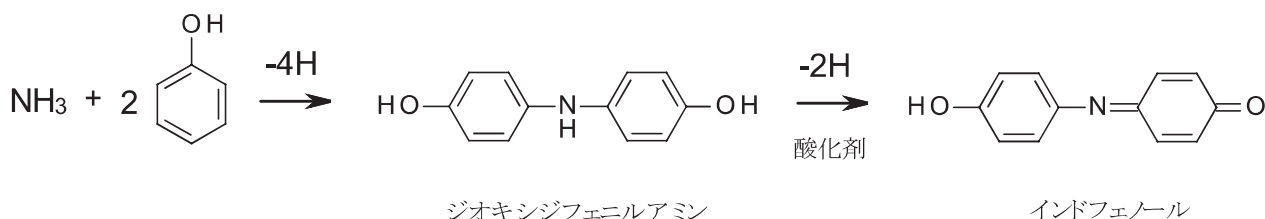
※マイクロプレート法の場合測定回数は700回、用手法の場合測定回数は60回

3. キットの保存と使用期限

2℃～10℃で保存し、凍結させないで下さい。使用期限はキット外箱のラベルに記載しています。

4. 測定原理

検体に除たん白試液を加えて除たん白することにより、呈色阻害成分を除去すると同時に検体中の諸酵素を失活させます。この上清に、フェノール、ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウムを加え、さらにアルカリ性としたのち、次亜塩素酸ナトリウムで酸化すると、インドフェノールを生成し青色を呈します。この青色の吸光度を測定することにより検体中のアンモニア窒素濃度を求めます。



※ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウム2水和物は触媒として作用します

5. キット以外に必要な器具・器材

マイクロプレート法の場合

- ・96 ウェルの透明マイクロプレート
- ・恒温槽 (37℃)*
- ・マイクロプレートリーダー (630nm 吸光フィルター)
- ・マイクロピペット
- ・プレートミキサー*

*マイクロプレートリーダーの機種によっては不要です

用手法の場合

- ・試験管またはマイクロチューブ
- ・恒温槽 (37℃)
- ・ピペット (試料採取用、試液分注用)
- ・分光光度計および630nm のフィルターをもつ比色計

6. 試薬の調製法

測定前の条件として、使用する試薬を必要量チューブなどに移し、下記の通り室温化または37℃にして下さい。

- *標準品、除たん白試液、標準希釈液を室温化*する。
- *発色試液 A、B、C は 1 時間恒温槽に入れ、37℃にする。
- *室温：20℃～25℃

(1) 標準液調製法 (マイクロプレート法)

付属の標準品をそのまま、または希釈して標準液 No.1～4 とします。

No.	標準品	標準品用希釈液	濃度
1	50 μL	150 μL	100 μg/dL
2	100 μL	100 μL	200 μg/dL
3	150 μL	50 μL	300 μg/dL
4	原液	—	400 μg/dL

(2) 標準液調製法 (用手法)

付属の標準品をそのまま、または希釈して標準液 No.1～4 とします。

No.	標準品	標準品用希釈液	濃度
1	200 μL	600 μL	100 μg/dL
2	400 μL	400 μL	200 μg/dL
3	600 μL	200 μL	300 μg/dL
4	原液	—	400 μg/dL

7. 検体の調製

全血検体

- ・血中アンモニアは、採血後室温に放置すると経時的に上昇します。あらかじめ除たん白試液を入れた試験管またはチューブに、採血後ただちに血液を入れ、すぐに混合し、遠心分離して下さい。
- ・上清は 2℃～10℃または氷水中に保存し、1 時間以内に測定して下さい。
- ・抗凝固剤のヘパリン、二重しゅう酸塩は使用しないで下さい。
- ・アミノ酸製剤は負誤差を与えますので注意して下さい。
- ・血中の各種アミノ酸は測定値に影響を与えることがあります。

8. 測定操作法

測定前の条件として、使用する試薬を必要量チューブなどに移し、下記の通り室温化または 37℃にして下さい。

- *標準品、除たん白試液、標準希釈液を室温化*する。
- *発色試液 A、B、C は 1 時間恒温槽に入れ、37℃にする。
- *室温：20℃～25℃

(1) マイクロプレート法

下記に従って、反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
最初の操作はマイクロチューブで行う			
除たん白試液	除たん白試液：血液 = 4：1 (v/v) と	除たん白試液：標準液 = 4：1 (v/v) と	70 μL
試料	るように調製。	なるように調製。	—
	よく混合する。遠心分離 5000×g、4℃、15 分間。以降の操作はウェル内で行う。	よく混合する。以降の操作はウェル内で行う。	
	上清 70 μL	混液 70 μL	—
発色試液 A	70 μL	70 μL	70 μL
発色試液 B	35 μL	35 μL	35 μL
発色試液 C	70 μL	70 μL	70 μL
各試薬をマイクロプレートに添加後、プレートミキサーでよく混合し、37℃で 20 分間加温。よく混合し、室温*で 30 分間静置。よく混合し、ブランクを対照として 630nm における検体及び標準液の吸光度を測定する。			

*室温：20℃～25℃

(2) 用手法

下記に従って、試験管またはマイクロチューブ内で反応させて下さい。

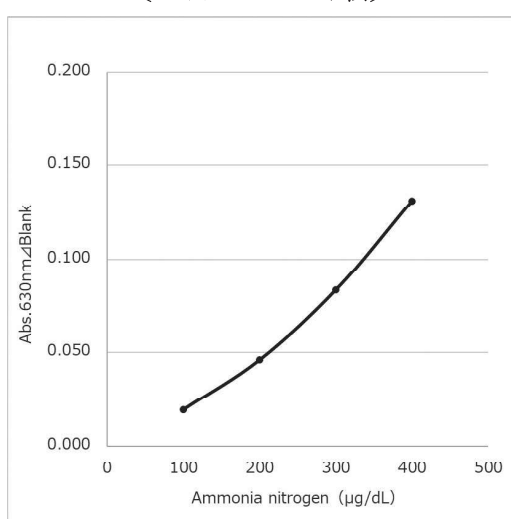
	テスト	スタンダード	ブランク
操作はマイクロチューブで行う			
除たん白試液	除たん白試液：血液 = 4：1 (v/v) と	除たん白試液：標準液 = 4：1 (v/v) と	800 μ L
試料	のように調製。	なるように調製。	—
	よく混合する。遠心分離 5000 \times g、4 $^{\circ}$ C、15分間。	よく混合する。	
	上清 800 μ L を別のチューブへ移す。	混液 800 μ L を別のチューブへ移す。	—
発色試液 A	800 μ L	800 μ L	800 μ L
発色試液 B	400 μ L	400 μ L	400 μ L
発色試液 C	800 μ L	800 μ L	800 μ L

各試薬をマイクロチューブに添加後、攪拌 (800rpm、30 秒 ポルテックスにて混合) し、37 $^{\circ}$ C で 20 分間加温。
 攪拌 (800rpm、30 秒) 後、30 分間水冷 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C)。
 攪拌 (800rpm、30 秒) 後、ブランクを対照として 630nm における検体及び標準液の吸光度を分光光度計を用いて測定する。

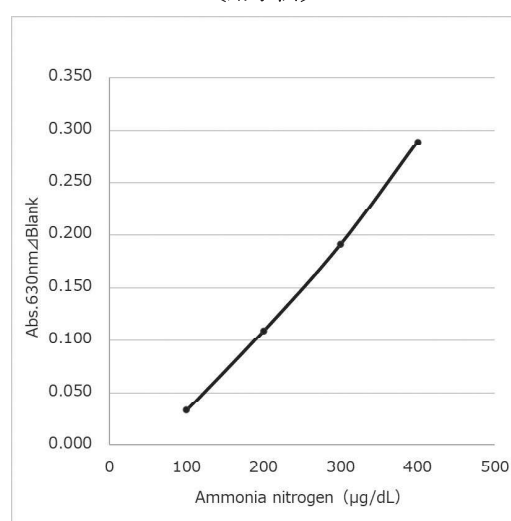
注：用手法で測定した場合、60 回用となります。

9. 標準曲線

〔マイクロプレート法〕



〔用手法〕



10. キットの性能

(1) 感度〔用手法〕

- ・精製水を試料として測定した場合の吸光度は、0.010 ~ 0.070 です。
- ・特定濃度の標準液 (アンモニア窒素 400 μ g/dL) を試料として測定した場合の吸光度は、0.200 ~ 0.370 の範囲内です。

(2) 特異性

- ・既知濃度の管理用血液を測定するとき、既知濃度の \pm 35%以内にあります。

11. 注意事項

(1) 測定上の注意

- ・この説明書に記載された使用方法に従って使用して下さい。記載された使用方法および使用目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証しかねます。
- ・測定機器は取扱説明書に従い、適切な条件下で使用して下さい。なお、詳細については、機器メーカーにお問い合わせ下さい。
- ・試薬は指定された条件で保管し、使用期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
- ・誤って凍結させた試薬は使用しないで下さい。正しい結果が得られないことがあります。
- ・試薬の開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は蓋を閉めて指定の条件で保存して下さい。
- ・本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。
- ・各試液は開栓したまま長時間放置しますと、アンモニアを吸収し、ばらつきの原因になります。密栓して 2 $^{\circ}$ C ~ 10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。
- ・直射日光を避けて操作して下さい。
- ・指定された反応温度、反応時間以外での使用は避けて下さい。
- ・測定に使用する器具は弱アルカリ性で良く洗浄後水道水で洗浄し、ついでイオン交換水で良くすすいだものを使用して下さい。水道水中、蒸留水中には、アンモニアが不揮発性のアンモニウム塩の形でかなりの量が含まれています。器具の洗浄には特に注意して下さい。

- ・遠心分離後、上清を採取する時、上清中に浮遊物が混入しないように注意して下さい。浮遊物の混入は呈色がばらつく原因となります。
 - ・操作は必ず正確な液量を用いて実施して下さい。液量が異なると、除たん白上清成分、呈色液の pH などが変動し、ばらつきの原因となります。
 - ・本品は体外診断用には使用できません。
- (2) 危険防止に関する注意
- ・試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、直ちに大量の水で洗い流し、必要があれば医師の手当などを受けて下さい。
 - ・除たん白試液は pH 3 以下の酸性溶液です。
 - ・発色試液 B、発色試液 C は pH 11 以上のアルカリ性溶液です。
 - ・ピペットをご使用の際は直接口で吸わないよう、必ず安全ピペッターなどを使用して下さい。
- (3) 廃棄に関する注意
- ・廃棄に際しては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（廃棄物処理法）および排水および排水基準に従って適切に処理して下さい。
 - ・発色試液 A 中にペンタシアノニトロシル鉄（Ⅲ）酸ナトリウム二水和物を 0.015%、フェノールを 40g/L 含有しています。
 - ・検体と接触した試薬及び試薬容器などは、感染の危険性があるものとして処理して下さい。

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【使用期限】

【備考】

【製品名】 ラボアッセイTM アンモニア
【和光コード】 297-94601
【英語表記】 LabAssayTM Ammonia
【貯法】 2 ～ 10℃ 保存
【使用期限】 ラベルに記載
【包装】 700 回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741