

LabAssay™ Creatinine

Please, read this instruction carefully before use.

1. Introduction

Creatinine is a breakdown product of creatine phosphate in muscle. It is mainly filtered by the kidneys, though a small amount is actively secreted. LabAssay™ Creatinine is based on an *in vitro* colorimetric Jaffé method for the quantitative determination of creatinine in mouse serum or urine. 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	150 mL/1 bottle
(2)	Picric Acid Reagent	liquid	50 mL/1 bottle
(3)	0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution	liquid	50 mL/1 bottle
(4)	Standard Solution	liquid	15 mL/1 bottle

※ Assay in a microplate ; 500 tests. Assay in a test tube ; 50 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 supernatant is separated, after adding deproteinizing reagent to a sample and centrifuging. Creatinine in the sample reacts with picric acid in alkaline solution to produce tangerine condensate (Jaffé reaction).

Quantitation of total creatinine in the sample can be made by measurement of the absorbance.

5. Materials and Apparatuses to be prepared

- 96 wells microplate (transparent type) ·Micropipette ·Incubator maintaining at 25°C - 30°C *
- Plate mixer *
- Microplate reader with 520 nm wavelength filter
- (* if the microplate reader is not equipped.)

(For Test Tube method)

- Test tube ·Pipette ·Spectrophotometer or colorimeter with 500 nm - 530 nm wavelength filter

6. Preparation of Reagents to be used

- ① Deproteinizing Reagent : ready-to-use
- ② Picric Acid Reagent : ready-to-use
- ③ 0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution : ready-to-use
- ④ Standard Solution

Standard solution is prepared by dilution of the provided Creatinine Standard

No.	Provided Std.	Distilled water for dilution	Sampling volume of diluted std.	Creatinine concentration
1	50 μ L	150 μ L	50 μ L	2.5 mg/dL
2	100 μ L	100 μ L	50 μ L	5.0 mg/dL
3	150 μ L	50 μ L	50 μ L	7.5 mg/dL
4	undiluted	—	50 μ L	10.0 mg/dL

7. Preparation of Samples

- Heparin, citrate, oxalate and EDTA as an anticoagulant and sodium fluoride as an antiglycolysis may not affect the assay.
- Toluene should be used as the preservative for urine samples.
- A substance with an active methylene group causes an increase of the value.
- Ascorbic acid, bilirubin and hemolysis may not significantly affect the assay.

8. Procedure

(1) Assay in a Microplate

Perform the assay according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
First operations should be performed in the sample tubes.			
Sample	Sample 50 μ L	Standard solution 50 μ L	Water 50 μ L
Deproteinizing Reagent	300 μ L	300 μ L	300 μ L
Mix well, and stand at room temperature for 10 min. Centrifuge over 2500 rpm for 10 min. Subsequent operations should be performed in the wells.			
Supernatant	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Stand at 25°C - 30°C			
Picric Acid Reagent	50 μ L	50 μ L	50 μ L
0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Stand at 25°C - 30°C for 20 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution at 520 nm with the blank solution as the control within the next 30 min.			

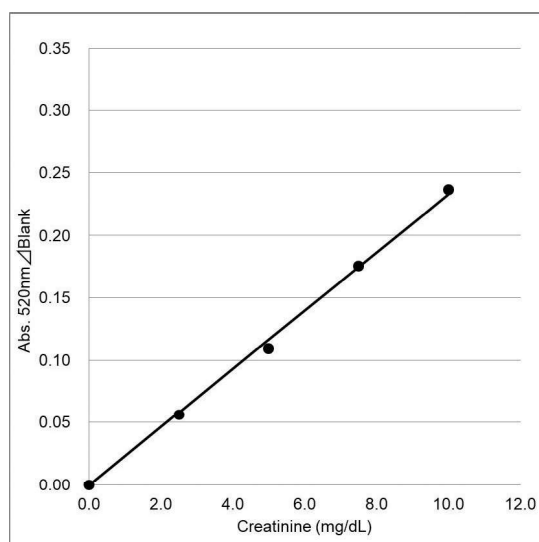
(2) Assay in a Test Tube

Perform the assay in a test tube according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Sample	Sample 0.5 mL	Standard solution 0.5 mL	Water 0.5 mL
Deproteinizing Reagent	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
Add with shaking, and stand at room temperature for 10 min. Centrifuge over 2500 rpm for 10 min.			
Supernatant	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Stand at 25°C - 30°C			
Picric Acid Reagent	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Stand at 25°C - 30°C for 20 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control within the next 30 min. Colorimeter with 500 nm - 530 nm wavelength filter. Spectrophotometer : 520 nm			

9. Standard Curve

[assay in a microplate]



10. Performance

(1) Sensitivity [assay in a Test Tube]

- The absorbance is 0.010 to 0.020, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.400 to 0.500, when measuring 10 mg/dL creatinine as a sample

(2) Specificity

The creatinine concentration is less than $\pm 10\%$, when measuring the known concentration of a control serum 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.
- The measurement should be done at an absorbance of 520 nm, although maximum absorption of the pigment is 480 nm, because picric acid may cause a high blank.
- Reaction temperature should be constant, because the temperature affects the assay value.
- Picric Acid Reagent and 0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution can be mixed beforehand. However, the mixed solution should be used within the day.
- 0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution should not be used if it is contaminated by Picric Acid Solution. Pay especially attentions not to contaminate with pipette.
- Urine creatinine samples below 10 mg/dL should be measured without the dilution.
- Acetone should not be used for drying of tubes, because it effects the absorbance.
- In the case of urine, if there are no opacity after addition of Deproteinizing Reagent, it is not necessary to centrifuge.
- This kit is for research use only, but not for diagnostic use.

(2) Safety Precautions

- If a reagent comes into contact with the mouth, eyes, or skin, immediately wash with a lot of water. Consult a physician if necessary.
- A pipette should be used with a safety pipette filler.
- Vials should be opened carefully

(3) Waste

- The waste should be processed appropriately according to the law.
- All the devices including reagents and vials that come into contact with specimens should be considered potentially infectious

[References]

1. Bonsnes, R. W. and Taussky, H. H. : *J. Biol. Chem.*, 158, 581 (1945).
2. Henry, R. J. : *Clinical Chemistry*, 287 (Harper & Row), New York (1966).

LabAssay™ Creatinine

[Storage]	Store at 2°C - 10°C
[Expiration date]	Indicated on the label
[Package]	For 500 tests
[Cat #]	291-93901

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 : +49-2131-31100
<http://www.wako-chemicals.de>

ラボアッセイ™ クレアチニン

1. はじめに

クレアチニンは、筋・神経内でクレアチンりん酸から直接に、あるいはクレアチンの脱水によって生成される物質です。老廃物であるクレアチニンは腎糸球体でろ過されて体外に排出されます。本品は Jaffé 反応を利用した特異性の高いクレアチニン測定キットです。マイクロプレート法によりマウス血清・尿中のクレアチニンの測定に用いることができます。用手法での測定も可能であり、また、ヒト検体中のクレアチニンの測定を行うこともできますが、体外診断用に用いることはできません。このキットは研究用のみにご使用下さい。

2. キット構成試薬

	構成試薬	状態	容量
(1)	Deproteinizing Reagent 除タンパク試薬	溶液	150mL/1本
(2)	Picric Acid Reagent ピクリン酸試薬	溶液	50mL/1本
(3)	0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution 0.75mol/L 水酸化ナトリウム溶液	溶液	50mL/1本
(4)	Standard Solution 標準液	溶液	15mL/1本

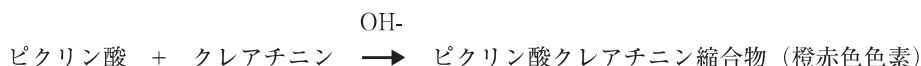
※マイクロプレート法の場合測定回数は500回、用手法の場合測定回数は50回

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

検体に除タンパク試薬を加えて遠沈後、上清を分離します。この上清にピクリン酸を作用させると、検体中のクレアチニンがアルカリ溶液中でピクリン酸と反応して橙赤色の縮合物を生じます (Jaffé 反応)。この橙赤色の吸光度を測定することにより検体中のクレアチニン濃度を求めます。



5. キット以外に必要な器具・器材

- ・96 ウェルの透明マイクロプレート
- ・恒温槽 (25℃～30℃) *
- ・マイクロプレートリーダー (520nm 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
- ・ピペット (試料採取用、試液分注用)
- ・分光光度計または 500nm～530nm のフィルターをもつ比色計

6. 試薬の調製法

- ① 除タンパク試薬：そのまま使用して下さい。
- ② ピクリン酸試薬：そのまま使用して下さい。
- ③ 0.75mol/L 水酸化ナトリウム溶液：そのまま使用して下さい。
- ④ 標準液調製法 (マイクロプレート法)

付属の標準液をそのまま、または希釈して標準液 No.1～4 とします。

No.	付属の標準液	蒸留水またはイオン交換水	試料採取量	濃度
1	50 μL	150 μL	50 μL	2.5mg/dL
2	100 μL	100 μL	50 μL	5.0mg/dL
3	150 μL	50 μL	50 μL	7.5mg/dL
4	原液	—	50 μL	10.0mg/dL

7. 検体の調製

血清・血漿検体／尿検体

- ・抗凝固剤のヘパリン、くえん酸塩、しゅう酸塩、EDTA 及び解糖防止剤のふっ化ナトリウムは、通常使用量では測定値に影響を与えません。
- ・尿の防腐剤としてはトルエンを使用して下さい。
- ・アスコルビン酸、ビリルビン及び溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
- ・活性メチレン基を有する物質は正誤差を与えます。
- ・採取後すぐに測定するか、長期に保存する場合は -35°C 以下で凍結保存して下さい。

8. 測定操作法

(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
	最初の操作はサンプルチューブで行う		
試料	検体 50 μL	標準液 50 μL	蒸留水または イオン交換水 50 μL
除タンパク試薬	300 μL	300 μL	300 μL
	よく混合する。室温で10分間放置。遠心分離 2500rpm 以上、10分間。		
	以降の操作はウェル内で行う		
上 清	100 μL	100 μL	100 μL
	25 $^{\circ}\text{C}$ ～30 $^{\circ}\text{C}$ に置く		
ピクリン酸試薬	50 μL	50 μL	50 μL
0.75mol/L 水酸化 ナトリウム溶液	50 μL	50 μL	50 μL
	25 $^{\circ}\text{C}$ ～30 $^{\circ}\text{C}$ で20分間放置。 次の30分以内にブランクを対照として検体及び標準液の吸光度（波長：520nm）を測定する。		

(2) 用手法

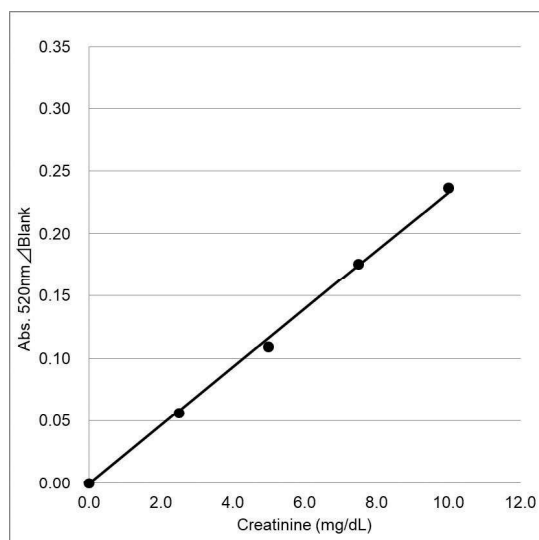
下記に従って、試験管中で反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
	最初の操作はサンプルチューブで行う		
試料	検体 0.5mL	標準液 0.5mL	蒸留水または イオン交換水 0.5mL
除タンパク試薬	3.0mL	3.0mL	3.0mL
	ふり混ぜながら加える。室温で10分間放置。 遠心分離 2500rpm 以上、10分間。		
上 清	2.0mL	2.0mL	2.0mL
	25 $^{\circ}\text{C}$ ～30 $^{\circ}\text{C}$ の水槽につける。		
ピクリン酸試薬	1.0mL	1.0mL	1.0mL
0.75mol/L 水酸化 ナトリウム溶液	1.0mL	1.0mL	1.0mL
	25 $^{\circ}\text{C}$ ～30 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽中で20分間放置。 次の30分以内にブランクを対照として検体及び標準液の吸光度を測定する。 比色計：500nm～530nmのフィルター 分光光度計：520nm		

注：用手法で測定した場合、50回用となります。

9. 標準曲線

[マイクロプレート法]



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 ~ 0.020 です。
- ・クレアチニン標準液 (10mg/dL クレアチニン) を試料として測定した場合の吸光度は、0.400 ~ 0.500 です。

(2) 特異性

- ・既知濃度の管理用血清を測定するとき、既知濃度の $\pm 10\%$ 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、機器メーカーに問い合わせして下さい。
- ・試薬は指定された保存条件で保管し、使用期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
- ・呈色液の極大吸収は480nm にありますが、この波長ではピクリン酸の吸収が大きく、ブランク値が高くなるので、520nm の波長を用いて測定します。
- ・反応温度によって吸光度が変化し、測定値にもわずかに差が見られますので、反応温度は一定にして操作して下さい。
- ・多数検体を処理される場合、ピクリン酸試薬と0.75mol/L水酸化ナトリウム溶液を等容量混合した発色試薬をあらかじめ調製しても構いません。この混合発色試薬は調製した当日中に使用して下さい。
- ・0.75mol/L水酸化ナトリウム水溶液はピクリン酸試薬で汚染されると使用できなくなります。操作中、ピペットによる汚染に特に注意して下さい。
- ・アセトンは同様に発色しますので試験管の乾燥その他に使用しないで下さい。
- ・尿の場合、除タンパク試薬を加えても混濁を認めない場合は遠心分離する必要はありません。
- ・原尿のクレアチニン濃度が10mg/dL 以下の場合、希釈せずに測定して下さい。
- ・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

- ・試薬が誤って口や目に入ったり、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てなどを受けて下さい。
- ・ピペット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。
- ・バイアル瓶の開栓はアルミキャップ部分で怪我をしないよう慎重に行って下さい。

(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）及び排水基準に従って適切に処理して下さい。
- ・検体と接触した試薬及び試薬容器などは、感染の危険があるものとして処理して下さい。

[参考文献]

1. Bonsnes, R. W. and Taussky, H. H. : *J. Biol. Chem.*, 158, 581 (1945).
2. Henry, R. J. : *Clinical Chemistry*, 287 (Harper & Row), New York (1966).

【測定名】	
【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 クレアチニン
【和光コード】 291-93901
【英語表記】 LabAssayTM Creatinine
【貯法】 2 ~ 10℃ 保存
【包装】 500 回用
【使用期限】 ラベルに記載

製造発売元
富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741