

LabAssay™ Triglyceride (GPO•DAOS method)

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

(Introduction)

Lipids in serum consist of triglycerides, cholesterol, phospholipids, free fatty acids and slight amounts of fat-soluble components such as fat-soluble vitamins and carotenes. Triglycerides, as major components of very low density lipoprotein (VLDL) and chylomicrons, play an important role in metabolism as energy sources and transporters of dietary fat.

LabAssay™ Triglyceride is based on an enzymatic method using *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS) as a blue pigment. This kit is used for the quantitative determination of triglycerides in mouse serum. It is a simultaneous multi-sample assay format using a microplate, but measurements can also be made using a test tube.

(Kit contents)

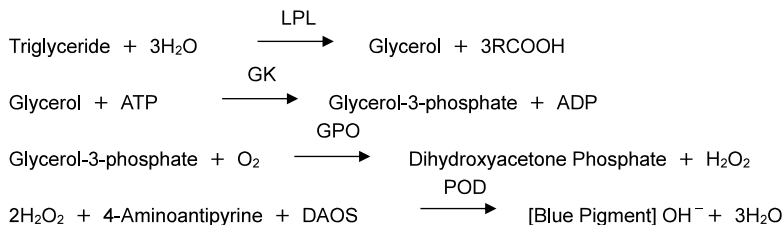
	Kit contents	State	Amount
(1)	Buffer Solution 50 mmol/L Good's (PIPES) buffer, pH6.5	liquid	105 mL/1 bottle
(2)	Chromogen Substrate (when reconstituted) Lipoprotein lipase 99 units/mL Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt Trihydrate (ATP) 1.7 mmol/L Glycerolkinase 30 units/mL Glycerol-3-phosphate Oxidase (GPO) 1.0 unit/mL Peroxidase (POD) 5.5units/mL <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3- sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS) 0.54 mmol/L 4-Aminoantipyrene 0.11 mmol/L Ascorbate Oxidase 4.5 units/mL	freeze dry	For 105 mL/1 bottle
(3)	Standard Solution Glycerol 31.2 mg/dL (Corresponding to 300 mg/dL Triolein) Contains Sodium Azide 0.05 %	liquid	4 mL/1 bottle

※Assay in a microplate;350 tests. Assay in a test tube; 35 tests.

(Assay principle)

Triglycerides in a sample are hydrolyzed to glycerol and free fatty acids in a reaction catalyzed by lipoprotein lipase (LPL). Glycerol is converted to glycerol-3-phosphate by glycerolkinase (GK) in the presence of ATP.

Glycerol-3-phosphate so formed is oxidized by glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) in a reaction that produces hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide produced causes DAOS and 4-Aminoantipyrene to undergo a quantitative oxidative condensation catalyzed by peroxidase (POD), producing a blue pigment. The amount of triglycerides contained in the sample is determined by measuring the absorbance of the blue color.



[Materials and apparatuses to be prepared]

- 96wells microplate (transparent type) ·Micropipette ·Incubator maintaining at 37 °C *
- Plate mixer*
- Microplate reader with 600 nm wavelength filter (* if the microplate reader is not equipped.)

(For test tube method)

- Test tube ·Pipette ·Incubator maintaining at 37 °C
- Spectrophotometer or colorimeter with 600 nm wavelength filter

[Preparation of reagents to be used]

① Chromogen Reagent :

Prepare Chromogen Reagent by Dissolving 1 vial of Chromogen Substrate (for 105 mL) to 105 mL of Buffer Solution. After reconstitution, the solution should be stored at 2 °C~10 °C and used within 10 days.

② Standard solution (Microplate method)

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard

No.	Triglyceride Standard	Distilled or deionized water	Sample volume	Triglyceride Concentration
1	100 μL	200 μL	2 μL	100 mg/dL
2	200 μL	100 μL	2 μL	200 mg/dL
3	undiluted	—	2 μL	300 mg/dL
4	undiluted	—	4 μL	596 mg/dL *1
5	undiluted	—	6 μL	888 mg/dL *1

* 1 The test sample volume is usually 2 μL, but 4 or 6 μL are taken in this case.

The triglyceride concentration must be corrected accordingly as indicated in the table above.

[Procedure]

(1) Assay in a microplate

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

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	300 μL	300 μL	300 μL
Sample	Serum 2 μL	Standard solution 2 μL	—
	Mix well and incubate at 37 °C for 5 min. Measure the absorbance at 600 nm *2 of the test sample and standard solution with the blank solution as the control.		

* 2 In two wavelength assay, measure using Main wavelength 600 nm/Sub wavelength 700 nm.

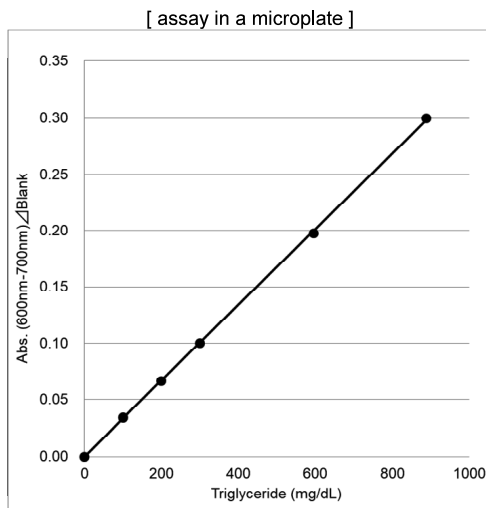
(2) Assay in a test tube

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

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
Sample	Serum 20 µL	Standard solution 20 µL	–
	Mix well and incubate at 37 °C for 5 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Colorimeter with 600 nm. Spectrophotometer : 600 nm ²		

* 2 In two wavelength assay, measure using Main wavelength 600 nm/Sub wavelength 700 nm

[Standard curve]



[Performance]

(1) Sensitivity [assay in a test tube]

- The absorbance is below 0.10, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.09 to 0.25, when measuring 300 mg/dL triglycerides as a sample.

(2) Specificity

The triglycerides concentration is less than ± 12 %, when measuring the known concentration of control serum as a sample.

[Usage Notes]

(1) Sample

- Samples should be used immediately after collecting.
- Hemolysis causes an increase of the triglycerides value.
- Ascorbic acid causes a slightly negative effect on the assay.
- Bilirubin may not significantly affect the assay.

(2) 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.

LabAssay™ Triglyceride (GPO·DAOS method)

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.
- The vial is sealed at reduced pressure. Slowly remove the stopper in order not to blow the powder in the vial.
- Do not use the reagents at other reaction temperatures and reaction times than described herein.
- The reaction induced by Chromogen Reagent is completed in about 5 min at 37 °C. The reaction is also completed within 15 min at room temperature of over 20 °C.
- When the incubation is continued at 37 °C, the absorbance gradually decreases. Therefore, the incubation should be done within 20 min.
- Color level of the reaction solution should show very little change within 1 hour at room temperature.
- This product calculates the concentration of triolein, which exists most within an organism. The concentration of glycerol is 31.2 mg/ dL (corresponding to 300 mg/dL triolein).
- This kit is for research use only. Not for diagnostic use.

(3) 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 with a safety pipette filler should be used.
- Be careful not to cut yourself with the aluminum cap when removing it from the vial.

(4) Waste

- The waste should be processed appropriately according to regulations.
- All the devices including reagents and vials that come into contact with specimens should be considered potentially infectious.
- Triglyceride Standard Solution contains 0.05 % sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive compounds. Even though the reagent contains minute quantity of sodium azide, drains should be flushed well with a large amount of water, when discarding the reagents.

[Reference]

1. Spayd, R. W., Bruschi, B. et al . : *Clin Chem .*, 24, 1343 (1978) .

LabAssay™ Triglyceride (GPO·DAOS method)

[Storage condition] Store the kit at 2 °C~10 °C

[Cat #] 632-50991

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

<https://www.fujifilm.com/ffwk/en>

研究用試薬

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。

『 **ラボアッセイ™ トリグリセライド (GPO・DAOS 法)** 』 **取扱説明書**

試験研究用試薬であり体外診断用に用いることはできません

1.はじめに

血清中の脂質は、トリグリセライド (中性脂肪)、コレステロール、りん脂質、遊離脂肪酸(NEFA)及び脂溶性ビタミン、カロチンなどの微量の脂溶性物質からなっています。超低比重リポ蛋白(VLDL ; very low density lipoprotein)やカイロミクロンの主要な構成成分であるトリグリセライドは食品中の油脂のエネルギー源やトランスporterなど、代謝において重要な役割を果たします。

本品はN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム(DAOS)を利用した青色発色系の酵素法試薬です。マイクロプレート法により、マウス血清中のトリグリセライド量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、ヒト血清中のトリグリセライドの測定を行うこともできます。

2.キットの保存と使用期限

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

3.キット構成試薬

構成試薬		状態	容量
(1)	緩衝液 50 mmol/L グッド(PIPES) 緩衝液、pH 6.5	溶液	105 mL/1 本
(2)	発色剤 溶解時 リボプロテインリパーゼ 99 units/mL アデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム 1.7 mmol/L 三水和物(ATP) グリセロールキナーゼ 30 units/mL グリセロール-3-りん酸オキシダーゼ (GPO) 1.0 units/mL ペルオキシダーゼ(POD) 5.5 units/mL N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム(DAOS) 0.54 mmol/L 4-アミノアンチピリン 0.11 mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ 4.5 units/mL	凍結乾燥	105 mL 用/1 本
(3)	標準液 グリセリン (トリオレイン 300 mg/dL 相当) アジ化ナトリウム 0.05 %含有	溶液	4 mL/1 本

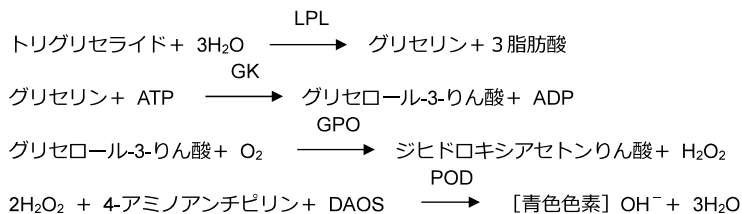
※マイクロプレート法の場合測定回数は 350 回、用手法の場合測定回数(は 35 回

4.測定原理

検体中のトリグリセライドは、リボプロテインリパーゼ (LPL) の作用によりグリセリンと脂肪酸に分解されます。生成したグリセリンは、ATP 存在下でグリセロールキナーゼ (GK) の作用によりグリセロール-3-りん酸になります。生成したグリセロール-3-りん酸は、グリセロール-3-りん酸オキシダーゼ (GPO) の作

LabAssay™ Triglyceride (GPO・DAOS method)

用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じます。生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼ（POD）の作用により DAOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成させます。この青色色素の吸光度を測定することにより検体中のトリグリセライド濃度を求めます。



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
- マイクロピペット
- 恒温槽 (37℃) *
- プレートミキサー*
- マイクロプレートリーダー (600 nm 吸光フィルター)
- * マイクロプレートリーダーの機種によっては不要です

用法の場合

- 試験管
- ピペット (試料採取用、試液分注用)
- 恒温槽 (37℃)
- 分光光度計または 600 nm のフィルターをもつ比色計

6.試薬の調製法

①発色試薬：発色剤 (105 mL 用) 1本を緩衝液 (105 mL) 1本で溶解し、発色試薬としてください。調製後、2℃～10℃保存で10日間使用できます。

②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.1～5 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	100 μL	200 μL	2 μL	100 mg/dL
2	200 μL	100 μL	2 μL	200 mg/dL
3	原液	—	2 μL	300 mg/dL
4	原液	—	4 μL	596 mg/dL *1
5	原液	—	6 μL	888 mg/dL *1

*1 試料の採取量は通常 2 μL ですが、この場合は 4 μL もしくは 6 μL 使用します。そのため液量が増加しますので補正した値です。

7.検体の調製

全血／血清／血漿検体

- ・採取後の検体は速やかに測定してください。
- ・溶血はわずかに正誤差を与えます。
- ・アルコールピニン酸はわずかに負誤差を与えます。
- ・ビリルビンは測定値にほとんど影響を与えません。

8.測定操作法

(1) マイクロプレート法

下記に従って、ウェル内で反応させてください。

	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	300 μL	300 μL	300 μL
試料	検体 2 μL	標準液 2 μL	—

	よく混合し、37℃で5分間加温。ブランクを対照として600 nm ^{*2} における検体及び標準液の吸光度を測定する。
--	--

*2 2波長測定の場合、主波長600 nm / 副波長700 nm。

(2) 用手法

下記に従って、試験管中で反応させてください。

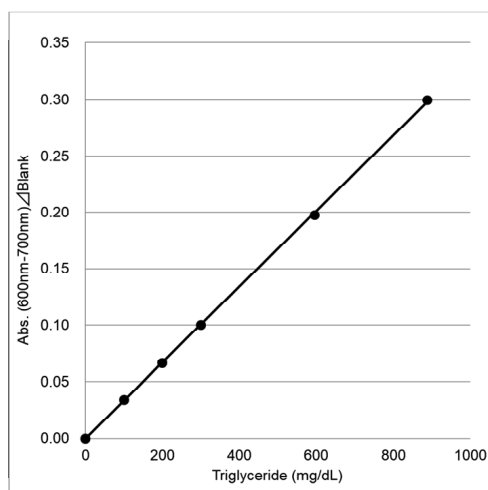
	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
試料	検体 20 µL	標準液 20 µL	—
	よく混合し、37℃で5分間加温。ブランクを対照として検体及び標準液の吸光度を測定する。比色計：600 nm のフィルター。分光光度計：600 nm ^{*2}		

注：用手法で測定した場合、35 回用となります。

*2 2波長測定の場合、主波長600 nm / 副波長700 nm。

9. 標準曲線

〔マイクロプレート法〕



10. キットの性能

● 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、0.10 以下です。
- ・ 特定濃度の標準液（トリグリセライド 300 mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.09 ~ 0.25 です。

● 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± 12 %以内にありませう。

注意事項

◆ 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ください。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ください。なお、詳細については、機器メーカーに問い合わせてください。
- 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ください。
- 誤って凍結させた試薬は使用しないでください。正しい結果が得られないことがあります。
- 試薬を開封した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ください。

LabAssay™ Triglyceride (GPO・DAOS method)

- 本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないでください。
- バイアル瓶の中は減圧になっていますので、開栓時は内容物を飛散させないよう静かに開けてください。
- 指定された反応温度、反応時間以外での使用は避けてください。
- 呈色反応は約5分で終了します。また20℃以上の室内温度で放置しても、呈色反応は15分以内で終了します。
- 37℃で加温を長時間続けると退色してきますので、長時間（20分以降）加温しないでください。
- 呈色は室温で1時間以内はほとんど変化ありません。
- 本品では生体中で最も多く存在するトリオレインとしての濃度を算出しています。標準液内のグリセリン濃度は31.2 mg/dL ですが、グリセリンの分子量 92.10、トリオレインの分子量 885.40 としてトリオレインに換算すると、300 mg/dL となります。
- 本品は体外診断用には使用できません。
- ◆危険防止に関する注意
- 試薬が誤って口や目に入った、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ください。
- 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ください。
- 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ください。
- ◆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ください。
- 検体と接触した試薬及び試薬容器などは、感染の危険性があるものとして処理してください。
- 標準液は防腐剤としてアジ化ナトリウムを0.05%含有しています。アジ化ナトリウムは、銅や鉛などの重金属と結合してアジ化物を形成します。重金属のアジ化物は、乾燥状態で衝撃により爆発する性質がありますので、排水後は、排水管に残留しないように十分の水で洗い流してください。

【参考文献】

1. Spayd, R. W., Bruschi, B. et al. : *Clin Chem* ., 24, 1343 (1978)

【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】

ラボアッセイ™ トリグリセライド（GPO・DAOS法）

【和光コード】

632-50991

【英語表記】

LabAssay™ Triglyceride (GPO・DAOS method)

【お問い合わせ先】

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

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>