

LabAssay™ Phospholipid (Choline Oxidase•DAOS method)

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

[Introduction]

Phospholipids are a class of lipids, and a major component of all biological membranes, along with glycolipids, cholesterol and proteins. LabAssay™ Phospholipid is based on an enzymatic methods 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 phospholipids 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 buffer, pH7.5)	liquid	50 mL/3 bottles
(2)	Chromogen Substrate After reconstitution Phospholipase D 0.47 units/mL Choline Oxidase 2.0 units/mL Peroxidase 4.2 units/mL <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy -3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS) 0.77 mmol/L 4-Aminoantipyrine 0.24 units/mL Ascorbate Oxidase 3.9 units/mL	freeze dry	For 50 mL/3 bottles
(3)	Standard Solution Choline Chloride 54 mg/dL (Corresponding to 300 mg/dL Phospholipid)	liquid	5 mL/1 bottles

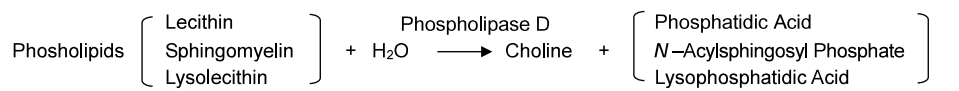
※Assay in a microplate;500 tests. Assay in a test tube; 50 tests.

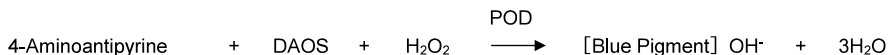
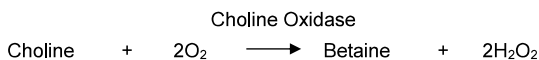
[Storage and expiration]

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.

[Assay principle]

Phospholipids (lecithin, sphingomyelin and lysolecithin) in a sample are hydrolyzed to choline in a reaction catalyzed by phospholipase D. Choline so formed is oxidized by choline oxidase in a reaction that produces hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide produced causes DAOS and 4-Aminoantipyrine to undergo a quantitative oxidative condensation catalyzed by peroxidase(POD), producing a blue pigment. The amount of phospholipids 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]

#### ①Chromogen Substrate :

Dissolve 1 vial of Chromogen Substrate with 50 mL of Buffer Solution. After reconstitution, the solution should be stored at 2 °C~10 °C and used within one week.

#### ②Standard solution (Microplate method)

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard

No.	Phospholipid Standard Solution	Distilled or deionized water	Sample volume	Phospholipid Concentration
1	50 µL	150 µL	2 µL	75.0 mg/dL
2	100 µL	100 µL	2 µL	150 mg/dL
3	Undiluted	—	2 µL	300 mg/dL
4	Undiluted	—	4 µL	596.1 mg/dL * <sup>1</sup>

\* 1 The test sample volume is usually 2 µL, but 4 µL is taken in this case. The phospholipids 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 * <sup>2</sup> 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

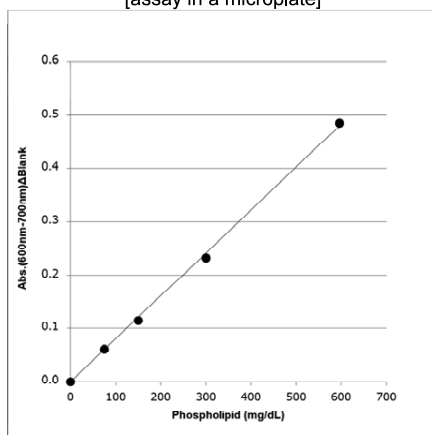
Perform the assay in a test tube according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
Sample	Serum 20 $\mu$ L	Standard solution 20 $\mu$ L	—
	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 <sup>*2</sup>		

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

**[Standard curve]**

[assay in a microplate]

**[Performance]**

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

- The absorbance is below 0.14, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.12 to 0.58, when measuring 300 mg/dL phospholipid as a sample.

## (2) Specificity

The phospholipid concentration is less than  $\pm 15\%$ , when measuring the known concentration of a control serum as a sample.

**[Usage Notes]**

## (1) Sample

- Samples should be used immediately after collecting.
- Ascorbic acid, bilirubin and hemolysis may not significantly affect the assay.
- This method measures lecithin, sphingomyelin, lysolecithin but not cephalin.

## (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.

#### LabAssay™ Phospholipid (Choline Oxidase·DAOS method)

- 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 reaction completes in about 3 min. It is enough to incubate at 37 °C for 5 min. When the incubation is continued, the absorbance gradually decreases. Therefore, the incubation should be done within 15 min.
- Color level of the reaction solution should show very little change within 1 hour at room temperature.
- 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 should be used with a safety pipette filler.

#### (4) 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.

#### [Reference]

Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T. and Tanimizu, I. : *Clin. Chim. Acta* .,79, 93 (1977) .

#### LabAssay™ Phospholipid (Choline Oxidase·DAOS method)

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

[Cat #]                     639-51001

## 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™ りん脂質（コリンオキシダーゼ・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

りん脂質は糖タンパク質、コレステロールやタンパク質と共に生体膜の主要な構成成分となる脂質です。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、マウス血清中のりん脂質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、ヒト血清中のりん脂質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。

2.キット構成試薬

構 成 試 薬		状 態	容 量
(1)	緩衝液 (50 mmol/L グッド緩衝液、 pH7.5)	溶液	50 mL/3 本
(2)	発色剤 溶解時 ホスホリパーゼ D 0.47 units/mL コリンオキシダーゼ 2.0 units/mL ペルオキシダーゼ 4.2 units/mL <i>N</i> -エチル- <i>N</i> -(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) 0.77 mmol/L 4-アミノアンチピリン 0.24 mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ 3.9 units/mL	凍結乾燥	50 mL 用/3 本
(3)	標準液 塩化コリン 54 mg/dL (りん脂質 300 mg/dL 相当)	溶液	5 mL/1 本

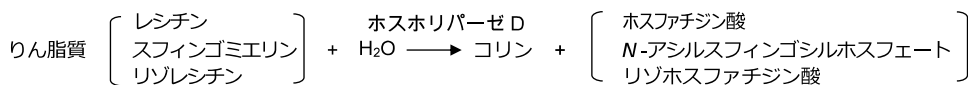
※マイクロプレート法の場合測定回数は 500 回、用手法の場合測定回数は 50 回

3.キットの保存と使用期限

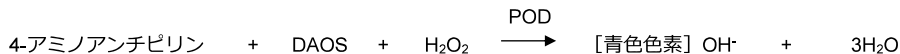
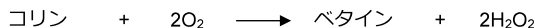
2℃～10℃で保存し、凍結させないでください。使用期限はキット外箱のラベルに記載しています。

4.測定原理

検体中のりん脂質（レシチン、リゾレシチン、スフィンゴミエリン）は、ホスホリパーゼ D の作用により加水分解され、コリンを遊離します。生成したコリンは、コリンオキシダーゼの作用を受けてベタインに酸化され、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、検体中のりん脂質濃度を求めます。



#### コリンオキシダーゼ



### 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

用手法の場合

- 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 (50 mL 用) 1本を緩衝液 (50 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1週間使用できます。
- 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 ～ 3 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	2 μL	75.0 mg/dL
2	100 μL	100 μL	2 μL	150 mg/dL
3	原液	—	2 μL	300 mg/dL
4	原液	—	4 μL	596.1 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 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。
- ・アルコルビン酸、ビリルビン、溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
- ・本法はりん脂質のうちレシチン、スフィンゴミエリン、リゾレシチンを測定しますがケファリンは測定しません。
- ・採血後すぐに測定するか、長期に保存する場合は -35℃以下で凍結保存してください。

## 8.測定操作法

### (1) マイクロプレート法

下記に従って、ウエ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 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
試料	血清 2 $\mu$ L	標準液 2 $\mu$ L	—
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として 600 nm <sup>*2</sup> 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) 手法

下記に従って、試験管中で反応させてください。

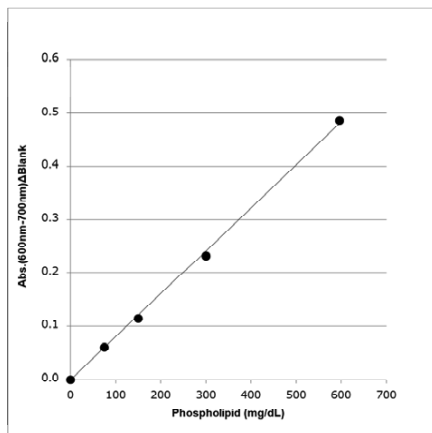
	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
試料	血清 20 $\mu$ L	標準液 20 $\mu$ L	—
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として検体及び標準液の吸光度を測定する。 比色計：600 nm のフィルター 分光光度計：600 nm <sup>*2</sup>		

注：用手法で測定した場合、50 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、0.14 以下です。
- ・特定濃度の標準液（りん脂質 300 mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.12 ～ 0.58 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 $\pm 15\%$ 以内にあります。

## 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。
- 呈色反応は約3分で終了しますので、37℃5分の加温で十分です。加温をさらに延長しますと徐々に退色が起こりますので、15分以上の加温は避けてください。
- 呈色は室内温度で1時間以内はほとんど変化ありません。
- 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。

### ◆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。

## 【参考文献】

Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T. and Tanimizu, I. : *Clin. Chim. Acta* .,79, 93 (1977) .

【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™ りん脂質（コリンオキシダーゼ・DASO 法）
【和光コード】	639-51001
【英語表記】	LabAssay™ Phospholipid (Choline Oxidase·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>