

研究用試薬

2021 年 2 月 1 日作成

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 ™ グルコース（ムタロターゼ・GOD 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

溶液中では一定の比率でα-D-グルコースとβ-D-グルコースとが存在しています。本品はα-D-グルコースをβ型に転移させるムタロターゼと、β-D-グルコースのみに作用するグルコースオキシダーゼを組み合わせた酵素法試薬です。マイクロプレート法によりマウス血清中のグルコース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、ヒト血清中のグルコース定量も行いますが、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ください。

2.キット構成試薬

構 成 試 薬		状 態	容 量
(1)	緩衝液 リン酸緩衝液 60 mmol/L, pH7.1 フェノール 5.3 mmol/L	溶液	150 mL/1 本
(2)	発色剤 溶解時 ムタロターゼ 0.13 units/mL グルコースオキシダーゼ (GOD) 9.0 units/mL ペルオキシダーゼ (POD) 0.65 units/mL 4-アミノアンチピリン 0.50 mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ (AOD) 2.7 units/mL	凍結乾燥	150 mL 用/1 本
(3)	標準液Ⅰ (ブドウ糖 200 mg/dL)	溶液	3 mL/1 本
(4)	標準液Ⅱ (ブドウ糖 500 mg/dL)	溶液	3 mL/1 本

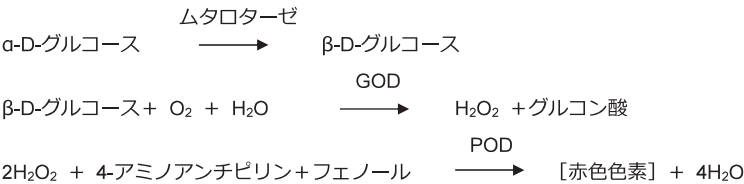
※マイクロプレート法の場合測定回数は 500 回、用手法の場合測定回数は 50 回

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

検体に発色試薬を作用させると検体中のα型グルコースはムタロターゼの作用によりβ型へ速やかに変換されます。β-D-グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) の作用を受けて酸化されると同時に過酸化水素を生成します。生成した過酸化水素は、共存するペルオキシダーゼ (POD) の作用により発色試薬中のフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させます。この赤色色素を測定することにより検体中のグルコース濃度を求めます。



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（505nm 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 505 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（150mL 用）1本を緩衝液（150 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か月間使用できます。
- ②標準液調製法（マイクロプレート法）
付属の標準液Ⅰ及び標準液Ⅱをそのまま、または希釈して標準液 No.1 ～ 6 とします。

No.	標準液Ⅰ	標準液Ⅱ	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	50 mg/dL
2	100 μL	－	100 μL	2 μL	100 mg/dL
3	原液	－	－	2 μL	200 mg/dL
4	－	150 μL	100 μL	2 μL	300 mg/dL
5	－	200 μL	50 μL	2 μL	400 mg/dL
6	－	原液	－	2 μL	500 mg/dL

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。
- ・全血をそのまま放置すると赤血球の解糖作用により血糖値が低下しますので、採血後は速やかに血球を分離してください。
- ・アルコールビン酸とピリルピンはわずかに負誤差を与えます。
- ・溶血はわずかに正誤差を与えます。
- ・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。
- ・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	2 μL	2 μL	－ ＊1
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として 505 nm ＊2 における検体及び標準液の吸光度を測定する。		

＊1 水 2 μL 添加の有無による吸光度の差は実際上ありませんので水の添加は省略しました。

＊2 2 波長測定の場合、主波長 505 nm ／副波長 600 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	20 μ L	20 μ L	— * ¹
	よく混合し、37 $^{\circ}$ C 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：505 nm のフィルター 分光光度計：505 nm * ²		

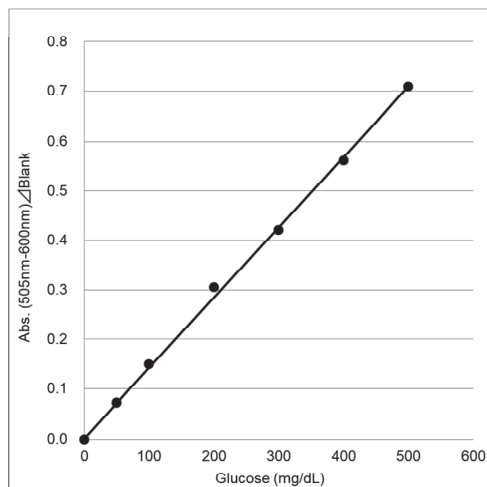
注：用手法で測定した場合、50 回用となります。

*¹ 水 20 μ L 添加の有無による吸光度の差は実際上ありませんので水の添加は省略しました。

*² 2 波長測定の場合、主波長 505 nm / 副波長 600 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、0.03 以下です。
- ・ 特定濃度の標準液（ブドウ糖 200 mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.40 ～ 0.55 です。

● 特異性

- ・ 既知濃度の管理用血清及び尿を測定するとき、既知濃度の $\pm$ 12 %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使用し、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ください。

LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method) (#LABGLUC-M1)

- 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。
 - 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。
 - 反応は約4分で終了します。37℃で長時間加温を続けると退色しますので、20分以上加温しないでください。
 - 室内温度（15℃以上）、15分間反応でも測定できます。
 - 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。
 - 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。
- 本品は緩衝液中にフェノールを500 mg/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ください。

【参考文献】

Miwa, I., Okuda, J., Maeda, K. and Okuda, G.: *Clin. Chim. Acta.*, 37, 538 (1972)

【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™ グルコース（ムタロターゼ・GOD法）		
【シバヤギコード】	LABGLUC-M1	【和光コード】	638-50971
【英語表記】	LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method) (LABGLUC-M1, FUJIFILM Wako Shibayagi, Gunma, Japan)		
【お問い合わせ先】			

製造

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1 TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com

<URL><http://www.shibayagi.co.jp>

販売

富士フイルム 和光純薬株式会社

LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method)

For Research Use Only Not for use in diagnostic procedure

[Introduction]

α-D-Glucose and β-D-glucose in solution maintain equilibrium in a constant ratio. Glucose oxidase reacts only with β-D-glucose and does not react with α-D-Glucose. Therefore, α-D-Glucose is converted into β-D-glucose using mutarotase.

LabAssay™ Glucose is the reagent kit for assay of glucose based on an enzymatic method with a combination of mutarotase and glucose oxidase.

The kit is used for the quantitative determination of glucose in mouse serum, plasma or urine. 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 Phosphate buffer, pH 7.1 60 mmol/L Phenol 5.3 mmol/L	liquid	150 mL/1 bottle
(2)	Chromogen Substrate After reconstitution Mutarotase 0.13 units/mL Glucose oxidase(GOD) 9.0 units/mL Peroxidase(POD) 0.65 units/mL 4-Aminoantipyrine 0.50 mmol/L Ascorbate oxidase(AOD) 2.7 units/mL	freeze dry	For 150 mL/1 bottle
(3)	Standard Solution I (200 mg/dL Glucose)	liquid	3 mL/1 bottle
(4)	Standard Solution II (500 mg/dL Glucose)	liquid	3 mL/1 bottle

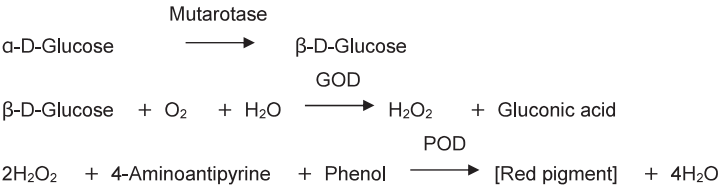
※Assay in a microplate;500 tests. Assay in a test tube; 50 tests.

[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]

When a sample is mixed with the Choromogen Reagent, the α-form of glucose in the sample is converted to β-form by mutarotase. β-D-Glucose is oxidized and yields hydrogen peroxide by glucose oxidase(GOD). In the presence of peroxidase(POD), the formed hydrogen peroxide yields a red pigment by quantitative oxidation condensation with phenol and 4-aminoantipyrine. The glucose concentration is obtained by measuring absorbance of the red pigment.



[Materials and apparatuses to be prepared]

- 96wells microplate (transparent type) · Micropipette · Incubator maintaining at 37 °C *
- Plate mixer *
- Microplate reader with 505 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 505 nm wavelength filter

[Preparation of reagents to be used]

① Chromogen reagent :

Dissolve 1 vial of Chromogen Substrate with 150 mL of Buffer. After reconstitution, the solution should be stored at 2 °C ~ 10 °C and used within 1 month.

② Standard solution (Microplate method)

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard Solution.

No.	Standard Solution I	Standard Solution II	Distilled or deionized water	Sample volume	Concentration
1	50 µL	—	150 µL	2 µL	50 mg/dL
2	100 µL	—	100 µL	2 µL	100 mg/dL
3	undiluted	—	—	2 µL	200 mg/dL
4	—	150 µL	100 µL	2 µL	300 mg/dL
5	—	200 µL	50 µL	2 µL	400 mg/dL
6	—	undiluted	—	2 µL	500 mg/dL

[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	2 µL	2 µL	— *1
	Mix well and incubate at 37 °C for 5 min. Measure the absorbance at 505 nm*2 of the test sample and standard solution with the blank solution as the control.		

*1 The addition of water is omitted because the absorbance difference in the presence of the addition of 2 µL of water does not exhibit any practical use.

*2 Use 505 nm (Main) and 600 nm (Sub) for two wavelengths.

(2) Assay in a test tube

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

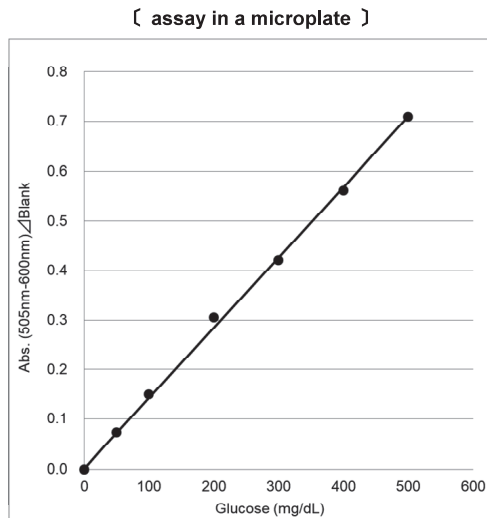
	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
Sample	20 µL	20 µL	— *1
	Mix well and incubate at 37 °C for 5 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Colorimeter with 505 nm. Spectrophotometer : 505 nm*2		

*1 The addition of water is omitted because the absorbance difference in the presence of the addition of 20 µL of water does not exhibit any practical use.

LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method) (#LABGLUC-M1)

* 2 Use 505 nm (Main) and 600 nm (Sub) for two wavelengths.

[Standard curve]



[Performance]

(1) Sensitivity [assay in a test tube]

- The absorbance is below 0.03, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.40 to 0.55, when measuring 200 mg/dL glucose as a sample.

(2) Specificity

The glucose concentration is less than $\pm 12\%$, when measuring the known concentration of a control serum or a urine as a sample.

[Usage Notes]

(1) Sample

- Samples should be used immediately after collecting.
- The glucose in whole blood decreases due to glycolysis in erythrocytes when a sample is kept after collecting blood. Therefore, separation of blood cells should be done as quickly as possible.
- Ascorbic acid and bilirubin cause a slightly negative effect on the assay.
- Hemolysis gives a slightly positive effect on the assay.
- Anticoagulants such as heparin, citrate, oxalate and EDTA and sodium fluoride as a glycolytic inhibitor, should not affect the assay when they are used in their usual amounts.

(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. 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 purposes other than those described

LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method) (#LABGLUC-M1)

herein.

- Do not use the reagents at other reaction temperatures and reaction times than described herein.
- The reaction completes in about 4 min at 37 °C . When the incubation is continued, the absorbance gradually decreases. Therefore, the incubation should be done within 20 min.
- Glucose can be also measured by a reaction at room temperature (15 °C or more) for 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 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.
Buffer contains 500 mg/L phenol.
- All the devices including reagents and vials that come into contact with specimens should be considered potentially infectious.

[Reference]

Miwa, I., Okuda, J., Maeda, K. and Okuda, G. : *Clin. Chim. Acta* ., 37, 538 (1972) .

LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method)

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

[Manufacture #] LABGLUC-M1

[Cat #] 638-50971

This kit is
manufactured by

FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation

1062-1 Ishihara, Shibukawa, Gunma, Japan 377-0007

TEL.+81-279(25)0279, FAX.+81-279(23)0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com

<URL><http://www.shibayagi.co.jp>

distributed by

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation