

LabAssay™ Phospholipid

1. 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.

2. Kit Contents

	Components	Use State	Amount
(1)	Buffer Solution	liquid	50 mL/3 bottles
(2)	Chromogen Substrate	freeze dry	For 50 mL/3 bottles
(3)	Standard Solution	liquid	5 mL/1 bottle

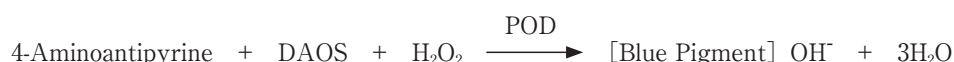
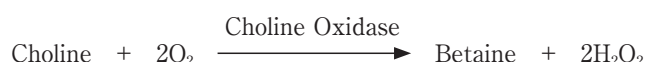
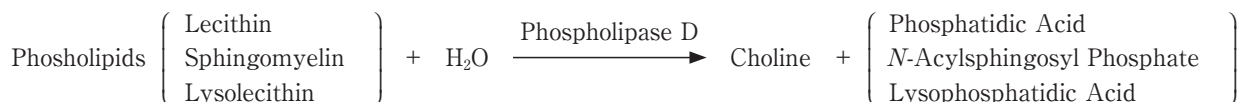
※ Assay in a microplate ; 500 tests. Assay in a test tube ; 50 tests.

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

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.



5. 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

6. Preparation of Reagents to be used

① Chromogen 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.

② Standard Solution (Microplate method)

Standard Solution is prepared by dilution of the provided Choline Chloride Standard.

No.	Standard Solution	Distilled or deionized water	Sample volume	Phospholipid Concentration
1	50 μ L	150 μ L	2 μ L	75.0 mg/dL
2	100 μ L	100 μ L	2 μ L	150 mg/dL
3	Undiluted	–	2 μ L	300 mg/dL
4	Undiluted	–	4 μ L	596.1 mg/dL ^{*1}

*1 The test sample volume is usually 2 μ L, but 4 μ L is taken in this case. The phospholipids concentration must be corrected accordingly as indicated in the table above.

7. Preparation of Samples

- 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.

8. Procedure

(1) Assay in a Microplate

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

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	300 μ L	300 μ L	300 μ L
Sample	Serum 2 μ L	Standard solution 2 μ L	–
	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

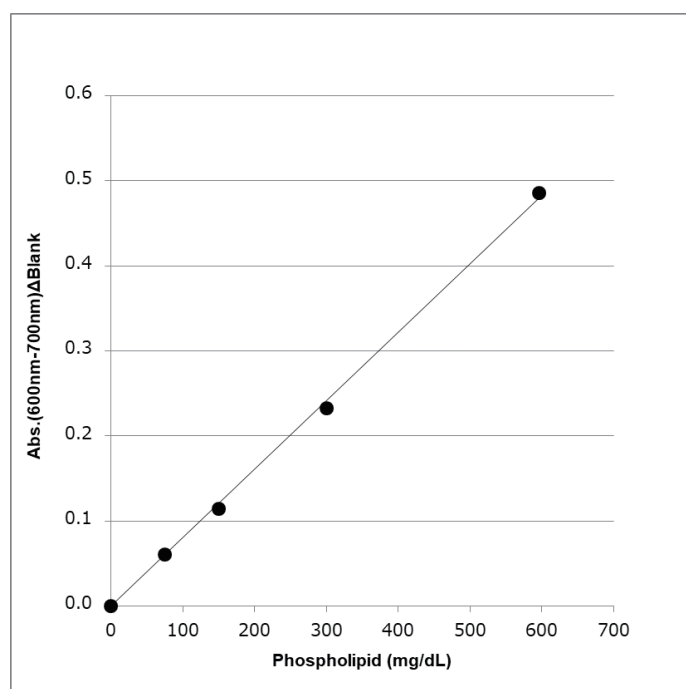
Perform the assay in a test tube according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
Sample	Serum 20 μ L	Standard solution 20 μ 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 ^{*2}		

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

9. Standard Curve

[assay in a microplate]



10. 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.

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 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.

(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.

(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.

[Reference]

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

LabAssay™ Phospholipid

[Storage] Store at 2°C - 10°C (Do not freeze)

[Expiration date] Indicated on the label.

[Package] For 500 tests

[Cat #] 295-94401

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 Bellwood 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™ リン脂質

1. はじめに

リン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、マウス血清中のリン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、ヒト血清中のリン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)	Buffer Solution 緩衝液	溶液	50mL/3 本
(2)	Chromogen Substrate 発色剤	凍結乾燥	50mL 用 /3 本
(3)	Standard Solution 標準品	溶液	5mL/1 本

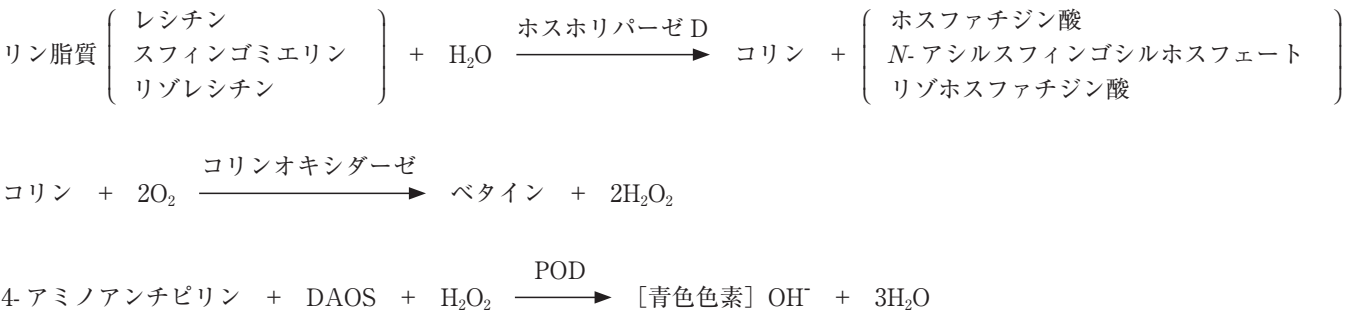
※マイクロプレート法の場合測定回数は500 回、用手法の場合測定回数は50 回

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

検体中のリン脂質（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、検体中のリン脂質濃度を求めます。



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 (600nm 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 600nm 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 (50mL 用) 1 本を緩衝液 (50mL) 1 本で溶解し、発色試薬として下さい。

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)

付属の塩化コリン標準品をそのまま、または希釈して標準液 No.1 ～ 3 とします。

No.	付属の標準品	蒸留水またはイオン交換水	試料採取量	濃度
1	50 μ L	150 μ L	2 μ L	75.0mg/dL
2	100 μ L	100 μ L	2 μ L	150mg/dL
3	原液	—	2 μ L	300mg/dL
4	原液	—	4 μ L	596.1mg/dL ^{*1}

*1 試料の採取量は通常 2 μ L ですが、この場合は 4 μ L 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

血清／血漿検体

- ・採取後の検体は速やかに測定して下さい。
- ・アルコールビン酸、ビリルビン、溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
- ・本法はリン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、ウェル内で反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	300 μ L	300 μ L	300 μ L
試料	血清 2 μ L	標準液 2 μ L	—
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として 600nm ^{*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 600nm ／副波長 700nm。

(2) 用手法

下記に従って、試験管中で反応させて下さい。

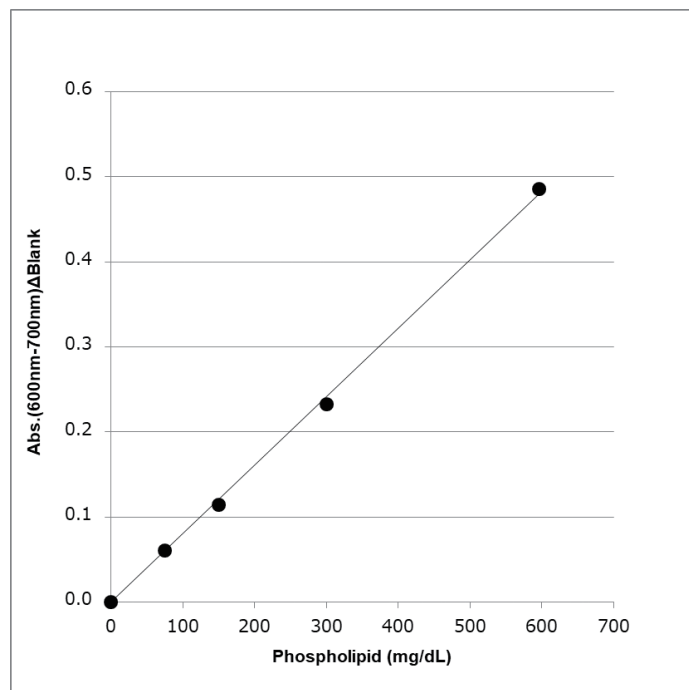
	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	3.0mL	3.0mL	3.0mL
試料	血清 20 μ L	標準液 20 μ L	—
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として検体及び標準液の吸光度を測定する。 比色計：600nm のフィルター 分光光度計：600nm ^{*2}		

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 600nm ／副波長 700nm。

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、0.14 以下です。
- ・特定濃度の標準液（リン脂質 300mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.12 ～ 0.58 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 $\pm 15\%$ 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。
- ・呈色反応は約 3 分で終了しますので、37℃で 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下さい。
- ・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。

(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。

(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、感染の危険性があるものとして処理して下さい。

〔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】	【使用期限】
【備考】	

【製品名】	ラボアッセイ TM リン脂質
【和光コード】	295-94401
【英語表記】	LabAssay TM Phospholipid
【貯法】	2 ～ 10℃ 保存
【使用期限】	ラベルに記載
【包装】	500 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