

LabAssay™ NEFA (FFA)

Please, read this instruction carefully before use.

1. Introduction

Non-esterified fatty acid (NEFA) in serum binding albumin, is used as an important energy source of peripheral tissues. LabAssay™ NEFA is the reagent kit for assay of NEFA based on an enzymatic method using 3-methyl-*N*-ethyl-*N*-(β -hydroxyethyl)-aniline (MEHA) as a violet color agent. The kit is used for the quantitative determination of NEFA 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	State	Amount
(1)	Chromogen Reagent A	Freeze dry	For 10 mL/4 bottles
(2)	Solvent A (for Chromogen Reagent A)	Liquid	45 mL/1 bottle
(3)	Chromogen Reagent B	Freeze dry	For 20 mL/4 bottles
(4)	Solvent B (for Chromogen Reagent B)	Liquid	90 mL/1 bottle
(5)	Standard Solution	Liquid	7 mL/1 bottle

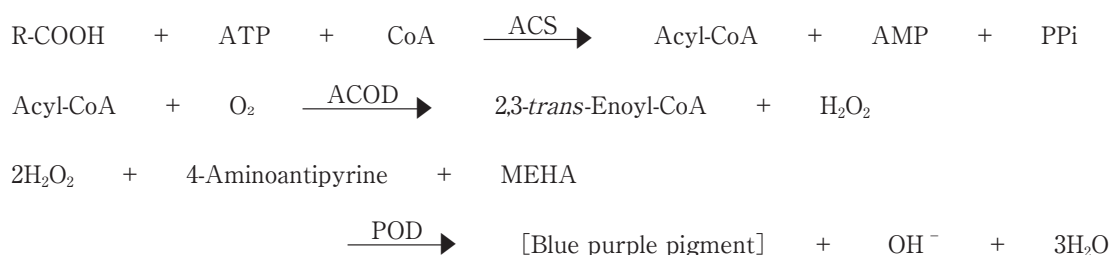
※ Assay in a microplate ; 500 tests. Assay in a test tube ; 40 tests.

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

Non-esterified fatty acid (NEFA) in the sample is converted to Acyl-CoA, AMP and Pyrophosphoric acid (PPi) by the action of Acyl-CoA synthetase (ACS), under coexistence with Coenzyme A (CoA) and Adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP). The obtained Acyl-CoA is oxidized and yields 2,3-*trans*-enoyl-CoA and hydrogen peroxide by the action of Acyl-CoA oxidase (ACOD). In the presence of peroxidase (POD), the hydrogen peroxide yields a blue purple pigment by quantitative oxidation condensation with 3-methyl-*N*-ethyl-*N*-(β -hydroxyethyl)-aniline (MEHA) and 4-aminoantipyrine. NEFA concentration is obtained by measuring absorbance of the blue purple pigment.



5. Materials and Apparatuses to be Prepared

(For Microplate Method)

- 96 wells microplate (transparent type) · Micropipette · Incubator maintaining at 37°C
- Plate mixer
- Microplate reader with a 550 nm wavelength filter

(For Test Tube Method)

- Test tube or microtube · Pipette · Incubator maintaining at 37°C
- Spectrophotometer or colorimeter with a 550 nm wavelength filter

6. Preparation of Reagents to be used

① Color Reagent A :

Prepare Reagent A by mixing 1 vial of each Chromogen Reagent A (for 10 mL) and Solvent A (for Chromogen Reagent A) (10 mL). After reconstitution, the solution should be stored below 25°C and used the same day, or stored at 2°C - 10°C

and used within 5 days.

② Color Reagent B :

Prepare Reagent B by mixing 1 vial of each Chromogen Reagent B (for 20 mL) and Solvent B (for Chromogen Reagent B) (20 mL). After reconstitution, the solution should be stored below 25°C and used the same day, or stored at 2°C - 10°C and used within 5 days.

③ Standard solution (Microplate method)

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

No.	Standard Solution	Distilled or deionized water	Sample volume	Concentration
1	80 μ L	120 μ L	4 μ L	0.40 mEq/L
2	120 μ L	80 μ L	4 μ L	0.60 mEq/L
3	160 μ L	40 μ L	4 μ L	0.80 mEq/L
4	Undiluted	—	4 μ L	1.00 mEq/L
5	Undiluted	—	8 μ L	1.97 mEq/L ^{*1}

*1 The test sample volume is usually 4 μ L, but 8 μ L is taken in this case. The NEFA concentration must be corrected accordingly as indicated in the table above.

7. Preparation of Samples

- Samples, especially mouse serum, should be used immediately after collecting, because enzymes such as lipoprotein lipase, phospholipase *etc.* hydrolyze lipids and form fatty acids. Freeze sample, when a serum is stored.
- Hemolysis gives a higher value on the assay.
- Bilirubin gives a lower value on the assay.
- Ascorbic acid does not have significant effects on the assay.

8. Procedure

(1) Assay in a Microplate

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

	Test	Standard	Reagent Blank	Sample Blank ^{*2}
Color Reagent A	80 μ L	80 μ L	80 μ L	80 μ L
Specimen	Serum 4 μ L	Standard 4 μ L	Distilled or Deionized water 4 μ L	—
Mix well ^{*3} and incubate at 37°C for 10 min.				
Color Reagent B	160 μ L	160 μ L	160 μ L	160 μ L
Specimen	—	—	—	Serum 4 μ L
Mix well ^{*3} and incubate at 37°C for 10min.				
After cooling the reaction solution to room temperature, measure the absorbance at 550 nm of the test sample and standard solution with the blank solution as the control within the next 30 min.				

*2 Sample blank is not required for common samples, but required for chyle or hemolyzed sample.

*3 Mix well with a plate mixer at 600 - 1,000 rpm for 1 minute. Be careful not to spill from the well.

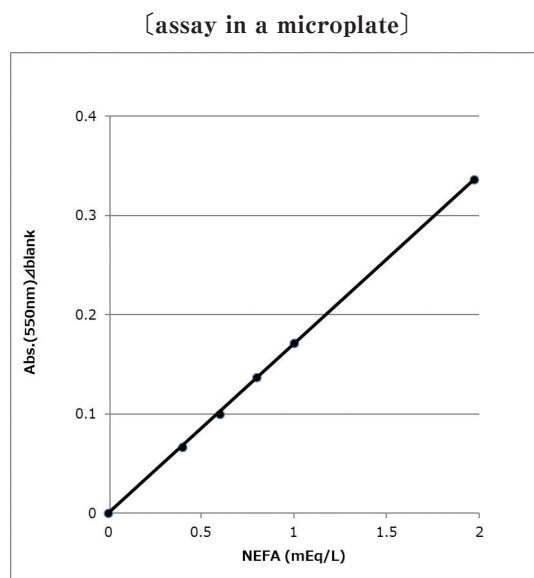
(2) Assay in a Test Tube

Perform the assay in the test tubes of the microtubes according to the following table scheme.

	Test	Standard	Reagent Blank	Sample Blank ^{*2}
Color Reagent A	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Specimen	Serum 0.05 mL	Standard 0.05 mL	Distilled or Deionized water 0.05 mL	—
Mix well and incubate at 37°C for 10 min.				
Color Reagent B	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Specimen	—	—	—	Serum 0.05 mL
Mix well and incubate at 37°C for 10 min.				
After cooling the reaction solution to room temperature, measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control within the next 30 min.				
Colorimeter with 550 nm filter				
Spectrophotometer : 550 nm				

*2 Sample blank is not required for common samples, but required for chyle or hemolyzed sample.

9. Standard Curve



10. Performance

(1) Sensitivity

- The absorbance is below 0.07, when measuring purified water as a specimen.
- The absorbance is 0.10 to 0.37, when measuring 1 mEq/L NEFA as a specimen.

(2) Specificity

The NEFA concentration is less than $\pm 15\%$, when measuring the known concentration of 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.
- 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 stoppered 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 Color Reagent A is completed in about 6 min at 37°C. Do not incubate more than 15 min.
- The reaction induced by Color Reagent B is completed in about 5 min at 37°C. When the incubation at 37°C is continued, absorbance decreases incrementally over time. Therefore, return it to room temperature immediately after the incubation for 10 min at 37°C.
- Avoid the direct sunlight during operation.
- 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 with a safety pipette filler should be used.
- Be careful not to cut yourself with the aluminum cap when removing it from the vial.

(3) Waste

- The waste should be processed appropriately according to regulations.
- All the devices including reagents and vials that come into contact with the specimen should be considered potentially infectious.
- Chromogen Reagent A and Solvent A (for Chromogen Reagent A) contain sodium azide as preservative (0.07% in Color A when reconstituted). 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.

LabAssayTM NEFA (FFA)

[Storage]

Store at 2°C - 10°C

[Expiration date]

Indicated on the container

[Package]

500 tests

[Cat #]

299-94301

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://ffwk.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 : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

ラボアッセイ™ NEFA (FFA)

1. はじめに

遊離脂肪酸 (NEFA) は血清中においてアルブミンと結合し、末梢組織の重要なエネルギー源となっています。本品はアシル CoA シンセターゼ (ACS) とアシル CoA オキシダーゼ (ACOD) 及び 3-メチル-N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-アニリン (MEHA) を利用した青紫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 NEFA 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 NEFA の定量を行うこともできます。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)	Chromogen Reagent A 発色剤 A	凍結乾燥	10mL 用 /4 本
(2)	Solvent A (for Chromogen Reagent A) 発色剤 A 溶解液	溶液	45mL/1 本
(3)	Chromogen Reagent B 発色剤 B	凍結乾燥	20mL 用 /4 本
(4)	Solvent B (for Chromogen Reagent B) 発色剤 B 溶解液	溶液	90mL/1 本
(5)	Standard Solution 標準液	溶液	7mL/1 本

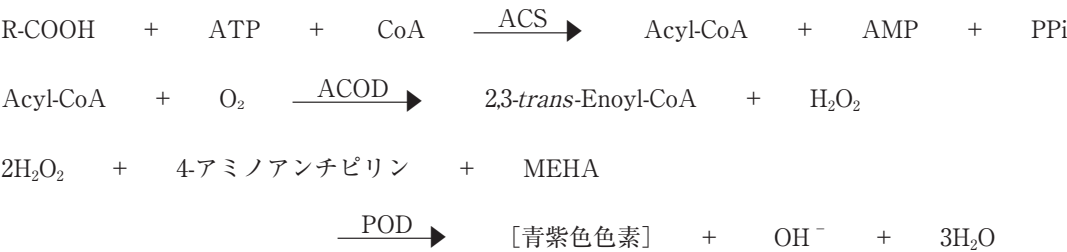
※マイクロプレート法の場合測定回数は 500 回、用手法の場合測定回数は 40 回

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

検体中の遊離脂肪酸 (NEFA) はコエンザイム A (CoA) とアデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム (ATP) の存在下、アシル CoA シンセターゼ (ACS) の作用により、アシル-CoA、AMP 及びピロリン酸 (PPi) を生成します。生成したアシル-CoA はアシル-CoA オキシダーゼ (ACOD) の作用により酸化され、同時に 2,3-trans-エノイル-CoA 及び過酸化水素を生成します。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 3-メチル-N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-アニリン (MEHA) と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青紫色の色素を生成させます。この青紫色の吸光度を測定することにより検体中の NEFA 濃度を求めます。



5. キット以外に必要な器具・器材

マイクロプレート法の場合

- ・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 (550nm 吸光フィルター)

用手法の場合

- ・試験管またはマイクロチューブ
- ・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 550nm のフィルターをもつ比色計

6. 試薬の調製法

- ①発色試薬 A：発色剤 A (10mL 用) 1 本を発色剤 A 溶解液 10mL で溶解し、発色試薬 A として下さい。
調製後、25℃以下保存で当日中、2℃～10℃保存で5日間使用できます。

②発色試薬 B：発色剤 B（20mL 用）1 本を発色剤 B 溶解液 20mL で溶解し、発色試薬 B として下さい。

調製後、25℃以下保存で当日中、2℃～10℃保存で5日間使用できます。

③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、または希釈して基準液 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	80 μ L	120 μ L	4 μ L	0.40mEq/L
2	120 μ L	80 μ L	4 μ L	0.60mEq/L
3	160 μ L	40 μ L	4 μ L	0.80mEq/L
4	原液	—	4 μ L	1.00mEq/L
5	原液	—	8 μ L	1.97mEq/L ^{*1}

*1 試料の採取量は通常 4 μ L ですが、この場合は 8 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

検体

- ・血液中には脂肪酸を生成させる酵素が存在しますので、採血後は速やかに測定して下さい。血清を保存する場合は凍結保存して下さい。マウスの場合は特に注意が必要です。
- ・溶血は正誤差を与えます。
- ・ビリルビンは負誤差を与えます。
- ・アスコルビン酸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下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク	検体盲検 ^{*2}
発色試薬 A	80 μ L	80 μ L	80 μ L	80 μ L
試料	血清 4 μ L	標準液 4 μ L	蒸留水または イオン交換水 4 μ L	—
よく混合し ^{*3} 、37℃で 10 分間加温。				
発色試薬 B	160 μ L	160 μ L	160 μ L	160 μ L
試料	—	—	—	血清 4 μ L
よく混合し ^{*3} 、37℃で 10 分間加温。 室温に戻し、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。 550nm 吸光フィルター				

*2 通常の試料では検体盲検は必要ありません。乳び血清または溶血した血清について行って下さい。

*3 プレートミキサーを用い、600～1,000rpm で 1 分間程度攪拌して下さい。

(2) 用手法

下記に従って試験管またはマイクロチューブ内で反応させて下さい。

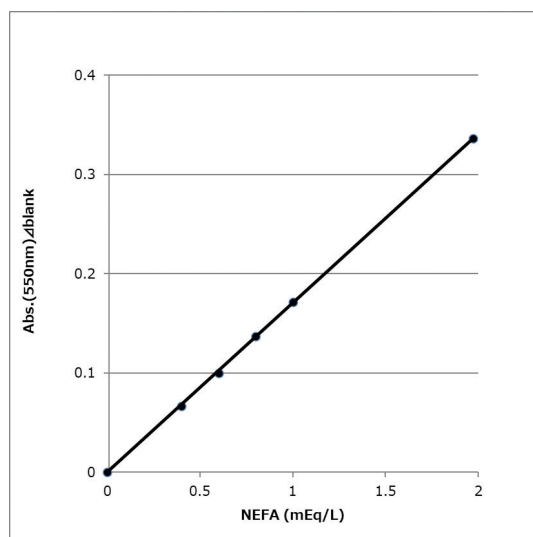
	テスト	スタンダード	ブランク	検体盲検 ^{*2}
発色試薬 A	1.0mL	1.0mL	1.0mL	1.0mL
試料	血清 0.05mL	標準液 0.05mLL	蒸留水または イオン交換水 0.05mL	—
よく混合し、37℃で 10 分間加温。				
発色試薬 B	2.0mL	2.0mL	2.0mL	2.0mL
試料	—	—	—	血清 0.05mL
よく混合し、37℃で 10 分間加温。 室温に戻し、30 分以内にブランクを対照として検体及び標準液の吸光度を測定する。 比色計：550nm フィルター 分光光度計：550nm				

注：用手法で測定した場合、40 回用となります。

*2 通常の試料では検体盲検は必要ありません。乳び血清または溶血した血清について行って下さい。

9. 標準曲線

〔マイクロプレート法〕



10. キットの性能

(1) 感度

- ・精製水を試料として測定した場合の吸光度は、0.07 以下です。
- ・特定濃度の標準液（遊離脂肪酸 1mEq/L）を試料として測定した場合の吸光度は、0.10 ～ 0.37 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。
- ・誤って凍結させた試薬は使用しないで下さい。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下さい。
- ・本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。
- ・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に静かに開けて下さい。
- ・指定された反応温度、反応時間以外での使用は避けて下さい。
- ・試料に発色試薬 A を加えて 37℃で加温しますと約 6 分で反応はほとんど終了します。15 分以上加温を続けることは避けて下さい。
- ・発色試薬 B を加え、37℃で加温しますと 5 分で反応はほとんど終了します。なお、37℃で加温を続けると、吸光度が徐々に下がる傾向があります。37℃ 10 分間加温後は直ちに室温に戻して下さい。
- ・測定中は直射日光を避けて下さい。
- ・本品は体外診断用としては使用できません。

(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。
- ・発色剤 A、発色剤 A 溶解液は防腐剤としてアジ化ナトリウムを含有しています（調製時、発色試薬 A 中に 0.07%）。標準液は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量の水で洗い流して下さい。

【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 NEFA（FFA）
【和光コード】	299-94301
【英語表記】	LabAssay TM NEFA（FFA）
【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