

LabAssay™ ATX

1. Intended use

This kit is a research reagent for measuring autotaxin (ATX).

ATX is a glycoprotein with a molecular weight of 125 kDa that was isolated as a cell migration promoting factor from the culture supernatant of human malignant melanoma cells. It is known that liver damage such as fibrosis causes metabolic inhibition of ATX, which leads to retention of ATX in the blood, resulting in an increase in its blood concentration.

2. Storage and expiration date

Store at 2°C - 10°C and do not freeze. The expiration date is indicated on the label on the outer box of the kit.

3. Kit Component Reagents

Components		Use Status	Amount
(1)	Reacting Solution	Solution	16 mL/1 bottle
(2)	Substrate	Freeze-dried	For 8 mL/1 bottle
(3)	Substrate Dissolving Solution	Solution	8 mL/1 bottle
(4)	ATX Standard	Freeze-dried	2 bottles
(5)	Buffer	Solution	5 mL/1 bottle
(6)	Stop Solution	Solution	16 mL/1 bottle

*For 150 tests

4. Principle of the method

Lysophosphatidylcholine is hydrolyzed by the lysophospholipase D activity of autotaxin (ATX) in the sample to form choline. The resultant choline is oxidized by the action of choline oxidase (COD) to form hydrogen peroxide. The resultant hydrogen peroxide oxidatively condenses n-ethyl-N-(3-sulfopropyl)-3-methylaniline (TOPS) and 4-aminoantipyrine quantitatively through the action of peroxidase (POD) to produce a blue-violet pigment. The reaction is stopped by addition of the Stop Solution and absorbance is measured to determine ATX activity in the sample.

5. Equipment or supplies required but not provided in the kit

- 96-well microplate (transparent type)
- Micropipette
- Microtube
- Pipette
- Incubator maintained at 37°C
- Plate mixer
- Microplate reader with 546 nm/700 nm wavelength filter

6. Preparation of reagents

- ① Reacting Solution : Ready to use. After opening the bottle, store at 2°C - 10°C and use within 4 weeks.
- ② Substrate Solution : Reconstitute 1 bottle of Substrate with 8 mL of Substrate Dissolving Solution to make the Substrate Solution. After preparation, store at 2°C - 10°C and use within 4 weeks.
- ③ Dilution series of ATX Standard : Reconstitute ATX Standard with purified water in the amount specified in "Reconstitution of standard"* to prepare the original standard solution (55 U/L). Then prepare a dilution series using the Buffer included in the kit that has been allowed to warm up to room temperature.

*Find and check "Reconstitution of standard" on this product page. As the amount of purified water to be added varies by lot, be sure to check it for every lot.

After preparing each concentration of the standard solution, use immediately and do not store.

Example of preparation of dilution series of standard solution

ATX activity (U/L)	55.0	27.5	13.8	6.88	3.44	1.72	0
ATX Standard (μL)	Original standard solution : 40	50*	50*	50*	50*	50*	-
Buffer (μL)	-	50	50	50	50	50	50

*One rank higher standard solution.

④ Stop Solution : Ready to use. After opening the bottle, store at $2^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$.

*If crystals have formed, return to room temperature, stir, and completely dissolve before use.

7. Preparation of specimen

Serum/Plasma

- Analyze specimens immediately after collection. If it is difficult to analyze immediately, store frozen until analysis.
- Do not use EDTA, an anticoagulant, because it influences the assay.
- The anticoagulant heparin does not significantly influence the assay when used in normal amounts.
- Hemolysis may influence the assay.
- Ascorbic acid does not affect the assay up to 10 mg/dL.
- Dilute specimen with saline and repeat the assay if the measured value exceeds the measurable range, and multiply the result by the dilution factor.

8. Assay procedure

Ensure that the reagents are brought up to room temperature ($20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$) before use.

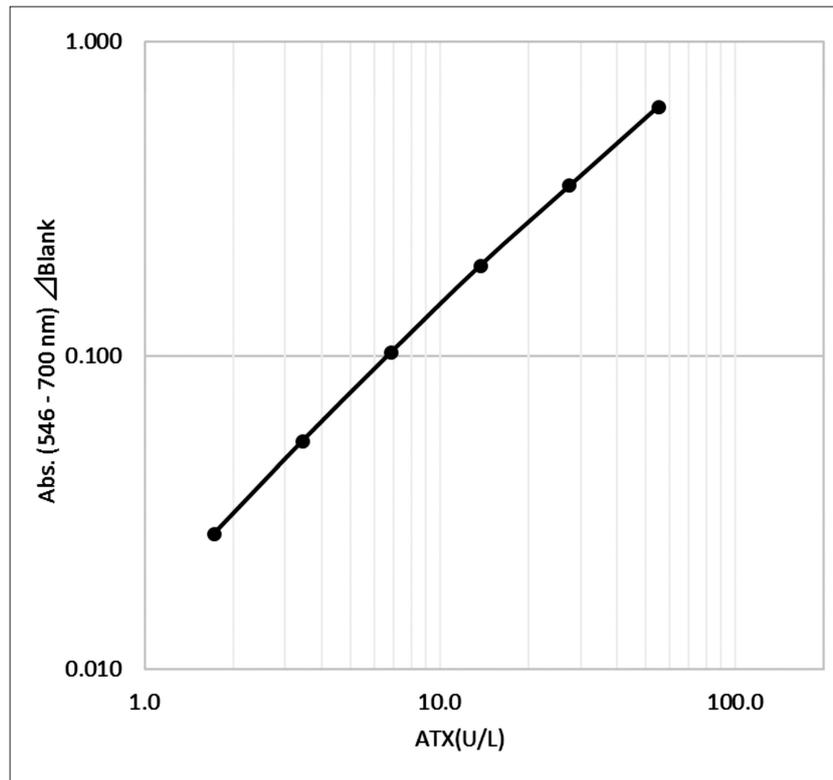
- (1) Dispense $100\ \mu\text{L}$ of Reacting Solution into each well of a 96-well microplate.
 - (2) Dispense $10\ \mu\text{L}$ of each concentration of standard solution into the well in which the standard is to be measured.
 - (3) Dispense $10\ \mu\text{L}$ of sample into the well in which the sample is to be measured.
 - (4) Shake the 96-well microplate on a plate mixer (*①).
 - (5) Allow to react in a incubator at 37°C for 20 minutes.
 - (6) Remove the 96-well microplate from the incubator and dispense $50\ \mu\text{L}$ of Substrate Solution into each well.
 - (7) Shake the 96-well microplate on a plate mixer (*①).
 - (8) Allow to react in a incubator at 37°C for 20 minutes.
 - (9) Remove the 96-well microplate from the incubator and dispense $100\ \mu\text{L}$ of Stop Solution into each well.
 - (10) Immediately after shaking (*①), measure the absorbance of each well at 546 nm (reference wavelength 700 nm) using a spectrophotometer for microplates.
- (*①) Guideline for shaking : 500 rpm - 600 rpm for 10 seconds, repeated 6 times.

9. Calculation

- (1) Create a calibration curve for each measurement, with the ATX activity (U/L) on the X-axis and absorbance on the Y-axis.
 - (2) From the calibration curve, read the ATX activity (U/L) corresponding to the absorbance of the sample. If a diluted sample is used, the concentration reading is multiplied by the sample dilution ratio to obtain the measurement value.
- *If the absorbance of a sample is outside the standard curve, dilute the sample with saline to an appropriate dilution ratio and repeat the assay.
- *In computer software calculations, we recommend using a cubic polynomial, or 4 or 5 parameters.

10. Standard Curve

- Measurement range : 1.72 - 55 U/L



11. Performance

- Sensitivity
 - When Buffer is measured as a sample, the absorbance is less than 0.05.
 - When a standard solution of a specific concentration (ATX 55 U/L) is measured as a sample, the absorbance ranges from 0.39 - 0.72.
- Accuracy
 - When control serum of known concentration is measured, the measured value is within $\pm 15\%$ of the known concentration.
- Simultaneous repeatability
 - When the same sample is measured simultaneously 5 times, the CV (%) of measured values is 15% or less.

Notes

- If any reagent accidentally comes into contact with the mouth, eyes, or skin, flush immediately with a large amount of water. Consult a physician if necessary.
- Handle samples being cognizant of the risk of infection (e.g., viruses).
- Wear disposable gloves to avoid the risk of infection when performing a test.
- Store reagents under the specified conditions and do not use expired reagents.
- Do not use reagents that have been accidentally frozen because accurate results may not be obtained.
- After opening, use the reagent as soon as possible. If it is stored, close the lid and store under the specified conditions.
- Do not top up any reagent.
- Be careful regarding contamination when collecting reagents with a pipette.
- Do not mix and use reagents with different lot numbers.
- As the pressure inside the Substrate vial is reduced, open it gently so that the contents do not spill out.
- Open vials carefully to avoid injury from the aluminum cap.
- When disposing of the reagents, dispose of them according to Waste Management and Public Cleansing Law (Waste Disposal and Cleaning Act) and wastewater standards. Substrate Solution contains cyano complex (156 mg/L as cyan).
- Any reagent or reagent bottle that comes into contact with a specimen should be considered potentially infectious and handled accordingly.
- Any scattering/splashes of samples or waste fluids should be removed with a disinfectant such as sodium hypochlorite (effective chlorine concentration 1,000 ppm) or glutaraldehyde (2%).

[References]

- (1) Masuda A. et al. : Clin Chim Acta., 412 (21-22) : 1944-1950 (2011).
- (2) Tokuhara Y. et al. : PLOS ONE, 10 (6) : e0130074 (2015).
- (3) Shao Y. et al. : Medicine (Baltimore), 98 (13) : e14973 (2019).
- (4) Weng J. et al. : J Cell Mol Med., 23 (2) : 1050-1058 (2019).
- (5) Shimamoto R. et al. : TOSOH Research & Technology Review, 61 : 99-103 (2017).

LabAssay™ ATX

[Storage] Store at 2°C - 10°C (Do not freeze)
[Term of validity] Indicated on the label.
[Package] For 150 tests
[Cat #] 293-96901

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

Fuggenstrasse 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™ ATX

1. はじめに

本製品は、オートタキシン (ATX) を測定する研究用試薬です。

ATX は、ヒト悪性黒色腫細胞の培養上清より、細胞遊走促進因子として単離された分子量 125kDa の糖タンパク質です。線維化などの肝障害により、ATX の代謝阻害が引き起こされることで、ATX が血中に滞留して血中濃度が上昇することが知られています。

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。

3. キット構成試薬

	構成試薬	状態	容量
(1)	反応液	液体	16mL/1本
(2)	基質剤	凍結乾燥品	8mL用/1本
(3)	基質剤溶解液	液体	8mL/1本
(4)	ATX 標準品	凍結乾燥品	2本
(5)	緩衝液	液体	5mL/1本
(6)	反応停止液	液体	16mL/1本

※150回テスト用

4. 測定原理

試料中のオートタキシン (ATX) のリゾホスホリパーゼ D 活性により、リゾホスファチジルコリンが加水分解されコリンが生成します。生成されたコリンは、コリンオキシダーゼ (COD) の作用により酸化され、過酸化水素を生成します。生成された過酸化水素は、ペルオキシダーゼ (POD) の作用により N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン (TOPS) 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色素を生成させます。最後に反応停止液を添加して反応を止め、吸光度を測定することにより試料中の ATX 活性を求めます。

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
- ・マイクロチューブ
- ・ピペット
- ・恒温槽 (37℃)
- ・マイクロプレート振とう器 (プレートミキサー)
- ・マイクロプレートリーダー (546nm/700nm 吸光フィルター)

6. 試薬の調製法

- ①反応液：そのままお使い下さい。開封後は 2℃～10℃ 保存で 4 週間以内に使用して下さい。
- ②基質液：基質剤 1 びんを基質剤溶解液 8mL で溶解し、基質液として下さい。調製後は 2℃～10℃ 保存で 4 週間以内に使用して下さい。
- ③ATX 標準品希釈系：ATX 標準品に精製水を「標準品原液の調製について」に記載の指定量*を加え溶解し、標準品原液 (55U/L) を調製して下さい。その後、室温化されたキット添付の緩衝液で調製して下さい。
*「標準品原液の調製について」は、当社製品ページより確認して下さい。ロットにより添加する精製水量が異なるため、必ずロットごとにご確認下さい。
各濃度に調製した標準液は、直ちに使用し、保存はしないで下さい。

標準品原液の希釈例

ATX活性(U/L)	55.0	27.5	13.8	6.88	3.44	1.72	0
ATX標準品 (μL)	原液: 40	50*	50*	50*	50*	50*	-
緩衝液 (μL)	-	50	50	50	50	50	50

*:ひとつ高濃度の標準溶液

- ④反応停止液：そのままお使い下さい。開封後は 2℃～10℃ で保存して下さい。

* 結晶が発生している場合は、室温に戻して攪拌し、完全に溶解させてからご使用下さい。

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。速やかに測定することが難しい場合は、冷凍保存し測定して下さい。
- ・抗凝固剤のEDTAは測定値に影響を与えますので使用しないで下さい。
- ・抗凝固剤のヘパリンは通常使用量では測定値にほとんど影響を与えません。
- ・溶血検体は、測定値に影響を与えることがあります。
- ・アスコルビン酸は、10mg/dLまで測定値に影響を与えません。
- ・測定範囲の上限を超える検体については、検体を生理食塩水で希釈して測定して下さい。得られた値に希釈倍数を乗じたものが測定値となります。

8. 測定操作法

試薬類を十分に室温（20℃～25℃）に戻してからご使用下さい。

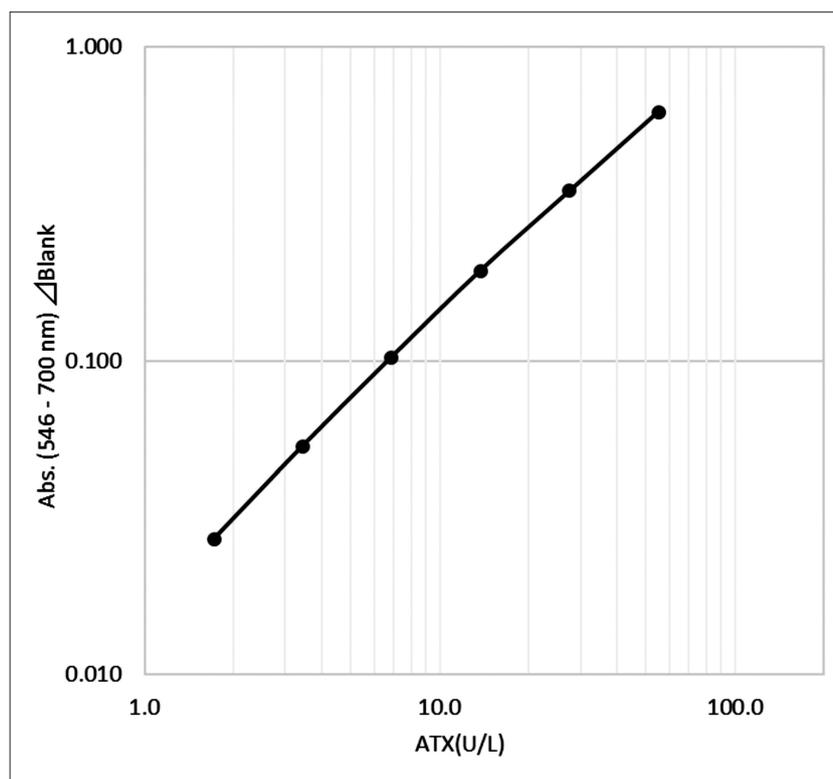
- (1) マイクロプレートに反応液を100 μ Lずつ分注します。
 - (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を10 μ Lずつ分注します。
 - (3) 検体測定ウェルに検体を10 μ Lずつ分注します。
 - (4) マイクロプレート振とう器などを用いて、攪拌（*①）します。
 - (5) 恒温槽内で37℃、20分間反応させます。
 - (6) マイクロプレートを恒温槽からだし、各ウェルに基質液を50 μ Lずつ分注します。
 - (7) マイクロプレート振とう器などを用いて、攪拌（*①）します。
 - (8) 恒温槽内で37℃、20分間反応させます。
 - (9) マイクロプレートを恒温槽からだし、各ウェルに反応停止液を100 μ Lずつ分注します。
 - (10) 攪拌（*①）後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で546nm（副波長700nm）での吸光度を測定します。
- （*①）攪拌の目安は500rpm～600rpm-10秒間、6回

9. 計算

- (1) 測定ごとに標準曲線を作成します。X軸にATX活性（U/L）、Y軸に吸光度の標準曲線グラフを作成して下さい。
 - (2) 標準曲線より、検体の吸光度に対応するATX活性（U/L）を読み取ります。希釈した検体を使用した場合は読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。
- * 検体の吸光度が標準曲線より外れた場合は、生理食塩水で適当倍率に調製し、再度測定を実施して下さい。
* コンピュータソフトでの演算処理では、3次多項式、4または5パラメーターの使用をお勧め致します。

10. 標準曲線

- ・測定範囲：1.72～55U/L



11. キットの性能

- ・ 感度
 - ・ 緩衝液を試料として測定した場合の吸光度は、0.05 未満です。
 - ・ 特定濃度の標準品（ATX 55U/L）を試料として測定した場合の吸光度は、0.39 ～ 0.72 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± 15% 以内です。
- ・ 同時再現性
 - ・ 同一検体を 5 回同時に測定する時、測定値の CV (%) は 15% 以下です。

注意事項

- ・ 試薬が誤って目や口に入ったり、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等を受けて下さい。
- ・ 検体はウイルス等の感染の危険性を考慮して取り扱って下さい。
- ・ 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用して下さい。
- ・ 試薬は指定された条件で保管し、使用期限の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管して下さい。
- ・ 試薬を継ぎ足して使用しないで下さい。
- ・ 試薬採取の際、ピペットからの汚染に注意して下さい。
- ・ ロット番号の異なる試薬を混ぜて使わないで下さい。
- ・ 基質剤のバイアル瓶の中は減圧となっていますので、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。
- ・ バイアル瓶の開栓はアルミキャップ部分でけがをしないように慎重に行って下さい。
- ・ 廃棄に際しては廃棄物の処理および清掃に関する法律（廃棄物処理法）および排水基準に従って適切に処理して下さい。基質液中にシアン錯体（シアンとして 156mg/L）を含有しています。
- ・ 検体と接触した試薬および試薬容器は、感染の危険性があるものとして処理して下さい。
- ・ 検体、廃液等が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 1,000ppm）、グルタルアルデヒド（2%）等の消毒液を用いて拭き取って下さい。

〔主要文献〕

- (1) Masuda A. et al. : Clin Chim Acta., 412 (21-22) : 1944-1950 (2011).
- (2) Tokuhara Y. et al. : PLOS ONE, 10 (6) : e0130074 (2015).
- (3) Shao Y. et al. : Medicine (Baltimore), 98 (13) : e14973 (2019).
- (4) Weng J. et al. : J Cell Mol Med., 23 (2) : 1050-1058 (2019).
- (5) 島本怜史, 他 : TOSOH Research & Technology Review, 61 : 99-103 (2017).

【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™ ATX
【和光コード】	293-96901
【英語表記】	LabAssay™ ATX
【貯法】	2℃～10℃保存
【使用期限】	ラベルに記載
【包装】	150 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