

(90 × 210mm Size)

〈For Research Use Only〉 Code No. 290-63701 (1,000 Tests)

Wako

LabAssay™ Triglyceride (GPO · DAOS method)

〔Introduction〕

Lipids in serum consist of triglycerides, cholesterol, phospholipids, free fatty acids and slight amounts of fat-soluble components such as fat-soluble vitamins and carotenes. Triglycerides, as major components of very low density lipoprotein (VLDL) and chylomicrons, play an important role in metabolism as energy sources and transporters of dietary fat. LabAssay™ Triglyceride is based on an enzymatic method using *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS) as a blue pigment. This kit is used for the quantitative determination of triglycerides 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〕

(1)	Buffer (50mmol/L Good's (PIPES) buffer, pH6.5)	105mL	3vials
(2)	Chromogen Substrate (when reconstituted) Lipoprotein lipase 99units/mL Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt Trihydrate (ATP) 1.7mmol/L Glycerolkinase 30units/mL Glycerol-3-phosphate Oxidase (GPO) 1.0unit/mL Peroxidase (POD) 5.5units/mL <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS) 0.54mmol/L 4-Aminoantipyrine 0.11mmol/L Ascorbate Oxidase 4.5units/mL [before reconstitute] Contains Sodium Hydroxide 8.01%.	For 105mL	3vials
(3)	Standard Solution (Glycerol 31.2mg/dL (Corresponding to 300mg/dL Triolein))	10mL	1vial

〔Materials and apparatuses to be prepared〕

- 96-well microplate (transparent type)
- Micropipette
- Incubator maintained at 37°C*
- Plate mixer*
- Microplate reader with a 600nm wavelength filter
(* if the microplate reader is not equipped.)

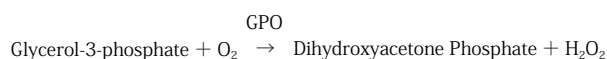
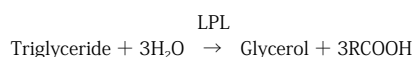
〔For test tube method〕

- Test tube
- Pipette
- Spectrophotometer or colorimeter with 600 nm wavelength filter

—1/10—

〔Assay principle〕

Triglycerides in a sample are hydrolyzed to glycerol and free fatty acids in a reaction catalyzed by lipoprotein lipase (LPL). Glycerol is converted to glycerol-3-phosphate by glycerolkinase (GK) in the presence of ATP. Glycerol-3-phosphate so formed is oxidized by glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) in a reaction that produces hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide produced causes DAOS and 4-Aminoantipyrine to undergo a quantitative oxidative condensation catalysed by peroxidase (POD), producing a blue pigment. The amount of triglycerides contained in the sample is determined by measuring the absorbance of the blue color.



〔Preparation of reagents to be used〕

- ① Color Reagent :
Prepare Color Reagent by Dissolving 1 vial of Chromogen substrate (for 105mL) to 105mL of Buffer. After reconstitution, the solution should be stored at 2-10°C and used within 10 days.
- ② Standard solution (Microplate method)
Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Triglyceride Standard	Distilled or deionized water	Sample volume	Triglyceride Concentration
1	100 μL	200 μL	2 μL	100 mg/dL
2	200 μL	100 μL	2 μL	200 mg/dL
3	Undiluted	—	2 μL	300 mg/dL
4	Undiluted	—	4 μL	596 mg/dL* ¹
5	Undiluted	—	6 μL	888 mg/dL* ¹

*1 The test sample volume is usually 2 μL, but 4 or 6 μL are taken in this case. The triglyceride concentration must be corrected accordingly as indicated in the table above.

—2/10—

[Procedure]

(1) Assay in a microplate

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

	Test	Standard	Blank
Color 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 600nm* ² of the test sample and standard solution with the blank solution as the control.			

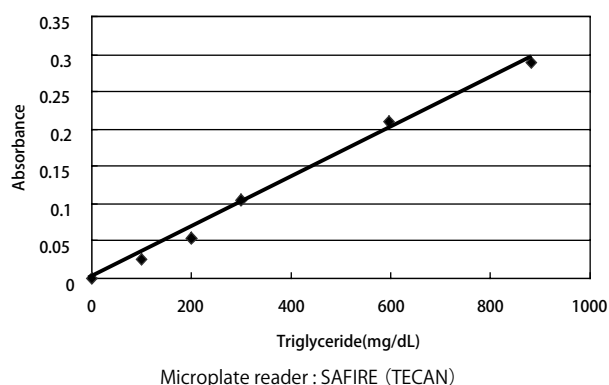
*2 In two wavelength assay, measure using Main wavelength 600nm/Sub wavelength 700nm.

(2) Assay in a test tube

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

	Test	Standard	Blank
Color reagent	3 mL	3 mL	3 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 600nm Spectrophotometer : 600nm* ²			

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

[Standard curve] [assay in a microplate]**[Performance]**

(1) Sensitivity [assay in a test tube]

- The absorbance is below 0.10, when measuring purified water as a sample.

- The absorbance is 0.09 to 0.25, when measuring 300mg/dL triglycerides as a sample.

(2) Specificity

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

[Usage Notes]

(1) Sample

- Samples should be used immediately after collecting.
- Hemolysis causes an increase of the triglycerides value.
- Ascorbic acid causes a slightly negative effect on the assay.
- Bilirubin may not significantly affect the assay.

(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 purpose other than those described herein.
- The vial is sealed 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 is completed in about 5 min at 37°C. The reaction is also completed within 15 min at room temperature of over 20°C.
- When the incubation is continued at 37°C, the absorbance gradually decreases. Therefore, the incubation should be done within 20 min.
- Color level of the reaction solution should show very little change within 1 hour at room temperature.
- This product calculates the concentration of triolein, which exists most within an organism. The concentration of glycerol is 31.2mg/dL (corresponding to 300mg/dL triolein).
- 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.
- All the devices including reagents and vials that come into contact with specimens should be considered potentially infectious.
- Triglyceride 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.

Expiration date : 12 months after the manufacture

Storage : Store at 2 ~ 10°C

Package : 1,000 tests

[Reference]

1. Spayd, R. W., Bruschi, B. *et al.* : *Clin Chem.*, **24**, 1343(1978).

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

Wako Chemicals GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

研究用試薬

コード No. 290-63701 (1,000 回用)

**ラボアッセイ™ トリグリセライド
(GPO・DAOS法)**

【はじめに】

血清中の脂質は、トリグリセライド（中性脂肪）、コレステロール、りん脂質、遊離脂肪酸（NEFA）及び脂溶性ビタミン、カロチンなどの微量の脂溶性物質からなっています。超低比重リポ蛋白（VLDL；very low density lipoprotein）やカイロミクロンの主要な構成成分であるトリグリセライドは食品中の油脂のエネルギー源やトランスポーターなど、代謝において重要な役割を果たします。

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、マウス血清中のトリグリセライド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、ヒト血清中のトリグリセライドの測定を行うこともできます。

【キット内容】

(1)	緩衝液 (50mmol/L グッド (PIPES) 緩衝液, pH6.5)	105mL	3本
(2)	発色剤 溶解時 リボプロテインリパーゼ 99units/mL アデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム 三水和物 (ATP) 1.7mmol/L グリセロールキナーゼ 30units/mL グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (GPO) 1.0unit/mL ペルオキシダーゼ (POD) 5.5units/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) 0.54mmol/L 4-アミノアンチピリン 0.11mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ 4.5units/mL [溶解前] 水酸化ナトリウム 8.01%含有。	105mL用	3本
(3)	基準液 (グリセリン 31.2mg/dL (トリオレイン 300mg/dL相当))	10mL	1本

【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°C)*
- 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)

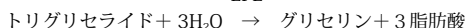
【用法の場合】

- 試験管
- ピペット (試料採取用、試液分注用)
- 分光光度計または 600nm のフィルターを持つ比色計

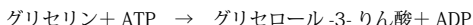
〔測定原理〕

検体中のトリグリセライドは、リポプロテインリパーゼ (LPL) の作用によりグリセリンと脂肪酸に分解されます。生成したグリセリンは、ATP 存在下でグリセロールキナーゼ (GK) の作用によりグリセロール-3-リン酸になります。生成したグリセロール-3-リン酸は、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (GPO) の作用を受けて酸化され、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トリグリセライド濃度を求めます。

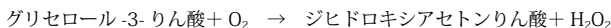
LPL



GK



GPO



POD



〔試薬の調製法〕

- ① 発色試薬：発色剤 (105mL 用) 1 本を緩衝液 (105mL) 1 本で溶解し、発色試薬として下さい。調製後、2～10℃ 保存で 10 日間使用できます。
- ② 基準液調製法 (マイクロプレート法)
付属の基準液をそのまま、または希釈して基準液 No.1～5 とします。

No.	付属の基準液	蒸留水またはイオン交換水	試料採取量	濃度
1	100 μL	200 μL	2 μL	100 mg/dL
2	200 μL	100 μL	2 μL	200 mg/dL
3	原液	—	2 μL	300 mg/dL
4	原液	—	4 μL	596 mg/dL*1
5	原液	—	6 μL	888 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 もしくは 6 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。

〔標準操作法〕

- (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 μL	300 μL	300 μL
試料	検体 2 μL	基準液 2 μL	—
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として 600nm*2 における検体及び基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

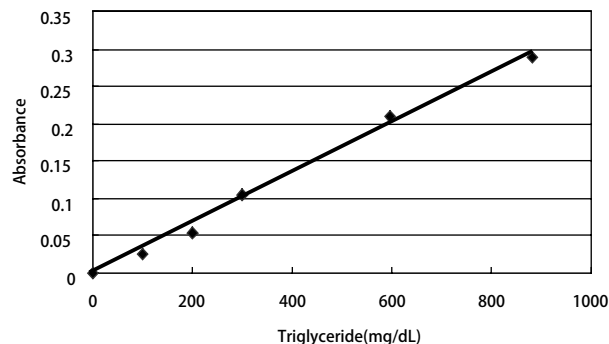
下記に従って、試験管中で反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	3 mL	3 mL	3 mL
試料	検体 20 μL	基準液 20 μL	—
	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基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、100 回用となります。

*2 2波長測定の場合、主波長 600nm/ 副波長 700nm

〔標準曲線〕 [マイクロプレート法]



マイクロプレートリーダー：SAFIRE (TECAN)

〔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、0.10 以下です。
 - ・特定濃度の基準液 (トリグリセライド 300mg/dL) を試料として測定した場合の吸光度は、0.09～0.25 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±12% 以内にあります。

〔使用上の注意〕

- (1) 検体
 - ・採取後の検体は速やかに測定して下さい。
 - ・溶血はわずかに正誤差を与えます。
 - ・アスコルビン酸はわずかに負誤差を与えます。
 - ・ビリルビンは測定値にほとんど影響を与えません。
- (2) 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ください。
 - 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。
 - 呈色反応は約5分で終了します。また20℃以上の室内温度で放置しても、呈色反応は15分以内で終了します。
 - 37℃で加温を長時間続けると退色してきますので、長時間（20分以降）加温しないで下さい。
 - 呈色は室温で1時間以内はほとんど変化ありません。
 - 本品では生体中で最も多く存在するトリオレインとしての濃度を算出しています。基準液内のグリセリン濃度は31.2mg/dLですが、グリセリンの分子量92.10、トリオレインの分子量885.40としてトリオレインに換算すると、300mg/dLとなります。
 - 本品は体外診断用には使用できません。

(3) 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ください。

(4) 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。
- 基準液は防腐剤として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ください。

使用期限：製造後 12ヶ月

貯 法：2～10℃保存

包 装：1,000回用

〔参考文献〕

1. Spayd, R. W., Bruschi, B. *et al.*: *Clin Chem.*, **24**, 1343(1978).

製造発売元

和光純薬工業株式会社

大阪市中央区道修町3-1-2
電話(06)6203-3741(代表)

1412K04