

(90 × 210mm Size)

<For Research Use Only> Code No. 296-63801 (1,300 Tests)

Wako LabAssay™ Phospholipid (Choline Oxidase · DAOS method)

For Research Use Only Not for Diagnostic Use

[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.

[Kit contents]

(1)	Buffer (50mmol/L Good's buffer, pH7.5)	50mL	8vials
(2)	Chromogen Substrate (when reconstituted) Phospholipase D 0.47units/mL Choline Oxidase 2.0units/mL Peroxidase 4.2units/mL <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS) 0.77mmol/L 4-Aminoantipyrine 0.24mmol/L Ascorbate Oxidase 3.9units/mL	For 50mL	8vials
(3)	Standard Solution (Choline Chloride 54mg/dL (Corresponding to 300mg/dL Phospholipid))	10mL	2vials

[Materials and apparatuses to be prepared]

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

[For test tube method]

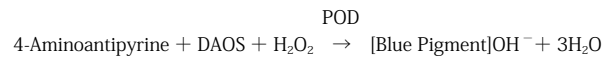
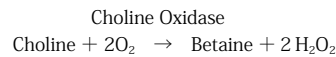
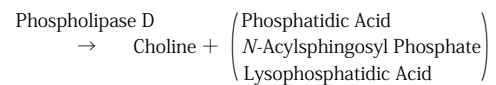
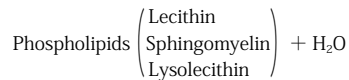
- Test tube
- Pipette
- Spectrophotometer or colorimeter with 600 nm wavelength filter

[Assay principle]

Phospholipids (lecithin, sphingomyelin and lysolecithin) in a sample are

—1/8—

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 catalysed 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.



[Preparation of reagents to be used]

① Color Reagent :

Prepare Color Reagent by Dissolving 1 vial of Chromogen substrate (for 50mL) to 50mL of Buffer. After reconstitution, the solution should be stored at 2-10°C and used within one week.

② Standard solution (Microplate method)

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Phospholipid Standard	Distilled or deionized water	Sample volume	Phospholipid Concentration
1	100 μL	100 μL	2 μL	150 mg/dL
2	Undiluted	—	2 μL	300 mg/dL
3	Undiluted	—	4 μL	596.1 mg/dL* ¹

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

[Procedure]

(1) Assay in a microplate

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

	Test	Standard	Blank
Sample	Serum 2 μL	Standard solution 2 μL	—
Color reagent	300 μL	300 μL	300 μL
	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.

—2/8—

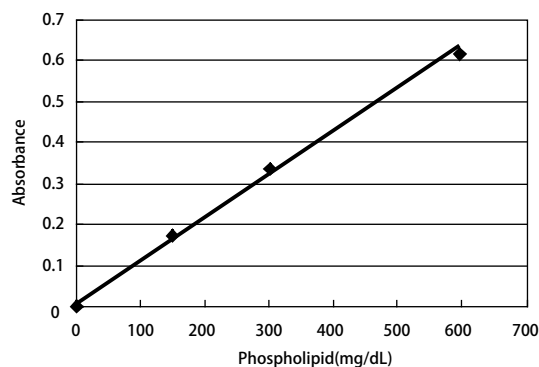
(2) Assay in a test tube

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

	Test	Standard	Blank
Sample	Serum 0.02 mL	Standard solution 0.02 mL	—
Color reagent	3 mL	3 mL	3 mL
	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]



Microplate reader : SAFIRE (TECAN)

[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 300mg/dL phospholipid as a sample.

(2) Specificity

- The phospholipid concentration is less than $\pm 10\%$, when measuring the known concentration of control serum as a sample.

[Usage Notes]

(1) Sample

- Ascorbic acid, bilirubin and hemolysis may not significantly affect the assay.
- This method measures lecithin, sphingomyelin, lysolecithin but not cephalin.

(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.
- 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.

(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 should be used with a safety pipette filler.

(4) 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.

Expiration date : 12 months after the manufacture

Storage : Store at 2 ~ 10°C

Package : 1,300 tests

[Reference]

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

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 : +49-2131-311-0
Facsimile : +49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

ラボアッセイ™ りん脂質 (コリンオキシダーゼ・DAOS 法)

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

〔はじめに〕

りん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、マウス血清中のりん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、ヒト血清中のりん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。

〔キット内容〕

(1)	緩衝液 (50mmol/L ゲット緩衝液, pH7.5)	50mL	8本
(2)	発色剤 溶解時 ホスホリパーゼ D 0.47units/mL コリンオキシダーゼ 2.0units/mL ペルオキシダーゼ 4.2units/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-ジメトキシアニンナトリウム (DAOS) 0.77mmol/L 4-アミノアンチピリン 0.24mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ 3.9units/mL	50mL 用	8本
(3)	りん脂質基準液 (塩化コリン 54mg/dL (りん脂質 300mg/dL 相当))	10mL	2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℃) *
- ・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)

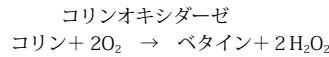
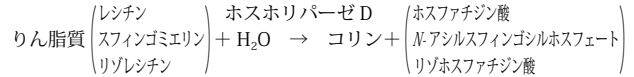
〔用手法の場合〕

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

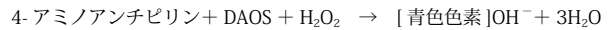
〔測定原理〕

検体中のりん脂質 (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、検体中のりん脂質濃度を求めます。



POD



〔試薬の調製法〕

- ① 発色試薬：発色剤 (50mL 用) を緩衝液 (50mL) で溶解し、発色試薬とします。調製後、2 ~ 10℃ 保存で 1 週間使用できます。
- 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 ~ 3 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	100 μL	2 μL	150 mg/dL
2	原液	—	2 μL	300 mg/dL
3	原液	—	4 μL	596.1 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 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
試料	血清 2 μL	基準液 2 μL	—
発色試薬	300 μL	300 μL	300 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) 手法

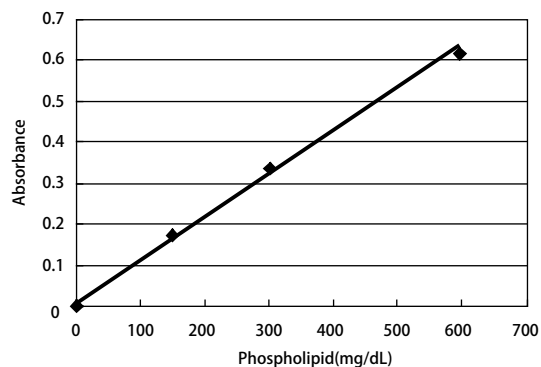
下記に従って、試験管中で反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
試料	血清 0.02 mL	基準液 0.02 mL	—
発色試薬	3 mL	3 mL	3 mL
	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、120 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 0.14 以下です。
 - ・特定濃度の基準液（りん脂質 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± 10%以内にありま

〔使用上の注意〕

- (1) 検体
 - ・アスコルビン酸、ビリルビン、溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
 - ・本法はりん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。
- (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。
 - ・呈色反応は約 3 分で終了しますので、37℃ 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。
 - ・呈色は室温で 1 時間以内はほとんど変化ありません。
 - ・本品は体外診断用としては使用できません。
- (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、必ず安全ピペットなどを使用して下さい。

(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、感染の危険があるものとして処理して下さい。

使用期限：製造後 12 ヶ月

貯 法：2 ～ 10℃保存

包 装：1,300 回用

〔参考文献〕

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

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)

0708K02