

**FUJIFILM****Wako**

<For Research Use Only> Code No. 290-65901 (500 Tests)

## LabAssay™ Creatinine (Jaffé method)

### [Introduction]

Creatinine is a breakdown product of creatine phosphate in muscle. It is mainly filtered by the kidneys, though a small amount is actively secreted. LabAssay™ Creatinine is based on an *in vitro* colorimetric Jaffé method for the quantitative determination of creatinine in mouse serum or urine. It is a simultaneous multi-sample assay format using a microplate, but measurements can also be made using a test tube.

### [Kit contents]

(1)	Deproteinizing Reagent (Sodium Tungstate, Phosphoric Acid)	150mL	1vial
(2)	Picric Acid Reagent (Picric Acid 22mmol/L)	50mL	1vial
(3)	0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution	50mL	1vial
(4)	Standard Solution (Creatinine 10mg/dL)	15mL	1vial

### [Materials and apparatuses to be prepared]

- 96wells microplate (transparent type)
- Micropipette
- Incubator maintaining at 25-30°C\*
- Plate mixer\*
- Microplate reader with 520nm wavelength filter  
(\* if the microplate reader is not equipped.)

### [For test tube method]

- Test tube
- Pipette
- Spectrophotometer or colorimeter with 500-530 nm wavelength filter

### [Assay principle]

The supernatant is separated, after adding deproteinizing reagent to a sample and centrifuging. Creatinine in the sample reacts with picric acid in alkaline solution to produce tangerine condensate (Jaffé reaction). Quantitation of total creatinine in the sample can be made by measurement of the absorbance.

### [Preparation of reagents to be used]

- ① Deproteinizing Reagent : ready-to-use
- ② Picric Acid Reagent : ready-to-use
- ③ 0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution : ready-to-use

### ④ Standard solution

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Provided Std.	Distilled water for dilution	Sampling volume of diluted std.	Creatinine concentration
1	50 μL	150 μL	50 μL	2.5mg/dL
2	100 μL	100 μL	50 μL	5.0mg/dL
3	150 μL	50 μL	50 μL	7.5mg/dL
4	undiluted	—	50 μL	10.0mg/dL

### [Procedure]

#### (1) Assay in a microplate

Perform the assay according to the following table scheme.

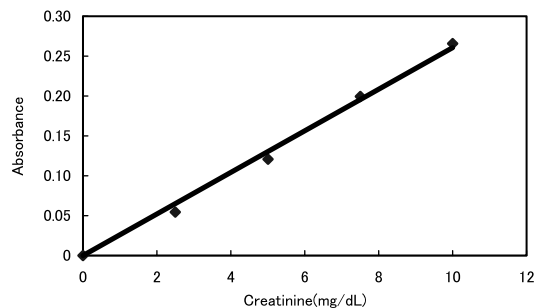
	Test	Standard	Blank
	First operations should be performed in the sample tubes.		
Sample	Sample 50 μL	Standard solution 50 μL	Water 50 μL
Deproteinizing Reagent	300 μL	300 μL	300 μL
	Mix well, and stand at room temperature for 10 min. Centrifuge over 2,500rpm for 10 min. Subsequent operations should be performed in the wells.		
Supernatant	100 μL	100 μL	100 μL
	Stand at 25-30°C.		
Picric Acid Reagent	50 μL	50 μL	50 μL
0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution	50 μL	50 μL	50 μL
	Stand at 25-30°C for 20 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution at 520nm with the blank solution as the control within the next 30 min.		

#### (2) Assay in a test tube

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

	Test	Standard	Blank
Sample	Sample 0.5mL	Standard solution 0.5mL	Water 0.5mL
Deproteinizing Reagent	3.0mL	3.0mL	3.0mL
	Add with shaking, and stand at room temperature for 10 min. Centrifuge over 2,500rpm for 10 min.		
Supernatant	2.0mL	2.0mL	2.0mL
	Stand at 25-30°C bath.		
Picric Acid Reagent	1.0mL	1.0mL	1.0mL
0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution	1.0mL	1.0mL	1.0mL
	Stand at 25-30°C for 20 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control within the next 30 min. Colorimeter with 500-530nm wavelength filter Spectrophotometer : 520nm		

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



Microplate reader : SAFIRE (TECAN)

**[Performance]**

(1) Sensitivity [assay in a test tube]

- The absorbance is 0.010 to 0.020, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.400 to 0.500, when measuring 10mg/dL creatinine as a sample.

(2) Specificity

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

**[Usage Notes]**

(1) Sample

- Heparin, citrate, oxalate and EDTA as an anticoagulant and sodium fluoride as an antiglycolysis may not affect the assay.
- Toluene should be used as the preservative for urine samples.
- A substance with an active methylene group causes an increase of the value.
- Ascorbic acid, bilirubin and hemolysis 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.
- The measurement should be done at an absorbance of 520nm, although maximum absorption of the pigment is 480nm, because picric acid may cause a high blank.
- Reaction temperature should be constant, because the temperature affects the assay value.
- Picric Acid Reagent and 0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution can be mixed beforehand. However, the mixed solution should be used within the day.
- 0.75mol/L Sodium Hydroxide Solution should not be used if it is contaminated by Picric Acid Solution. Pay especially attentions not to contaminate with pipette.

- Urine creatinine samples below 10mg/dL should be measured without the dilution.
- Acetone should not be used for drying of tubes, because it effects the absorbance.
- In the case of urine, if there are no opacity after addition of Deproteinizing Reagent, it is not necessary to centrifuge.
- This kit is for research use only, but 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.
- Vials should be opened carefully.

(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** : 30 months after the manufacture

**Storage** : Store at 2 ~ 10°C

**Package** : 500 tests

**[References]**

1. Bonsnes, R. W. and Taussky, H. H. : *J. Biol. Chem.*, **158**, 581 (1945).
2. Henry, R. J. : *Clinical Chemistry*, 287 (Harper & Row), New York (1966).

---

**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://www.wako-chem.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™ クレアチニン (Jaffé 法)

## 〔はじめに〕

クレアチニンは、筋・神経内でクレアチンりん酸から直接に、あるいはクレアチンの脱水によって生成される物質です。老廃物であるクレアチニンは腎糸球体でろ過されて体外に排出されます。

本品は Jaffé 反応を利用した特異性の高いクレアチニン測定キットです。マイクロプレート法によりマウス血清・尿中のクレアチニン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、ヒト検体中のクレアチニンの測定を行うこともできます。

## 〔キット内容〕

番号	内容	容量	本数
(1)	除タンパク試薬 (タングステン酸ナトリウム、りん酸を含む)	150mL	1 本
(2)	ピクリン酸試薬 (ピクリン酸 22mmol/L)	50mL	1 本
(3)	0.75mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (水酸化ナトリウム 0.75mol/L)	50mL	1 本
(4)	クレアチニン標準液 (クレアチニン 10mg/dL)	15mL	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 (25 ~ 30℃)\*
- ・プレートミキサー\*
- ・マイクロプレートリーダー (520nm 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 500 ~ 530nm のフィルターを持つ比色計

## 〔測定原理〕

検体に除タンパク試薬を加えて遠沈後、上清を分離します。この上清にピクリン酸を作用させると、検体中のクレアチニンがアルカリ溶液中でピクリン酸と反応して橙赤色の縮合物を生じます (Jaffé 反応)。この橙赤色の吸光度を測定することにより検体中のクレアチニン濃度を求めます。



ピクリン酸 + クレアチニン → ピクリン酸クレアチニン縮合物 (橙赤色素)

## 〔試薬の調製法〕

- ① 除タンパク試薬 : そのまま使用して下さい。
- ② ピクリン酸試薬 : そのまま使用して下さい。
- ③ 0.75mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : そのまま使用して下さい。

## ④ 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、または希釈して標準液 No.1 ~ 4 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	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L	50 $\mu$ L	2.5mg/dL
2	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L	5.0mg/dL
3	150 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	7.5mg/dL
4	原液	—	50 $\mu$ L	10.0mg/dL

## 〔標準操作法〕

### (1) マイクロプレート法

下記に従って、反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
	最初の操作はサンプルチューブで行う。		
試料	検体 50 $\mu$ L	標準液 50 $\mu$ L	蒸留水又はイオン交換水 50 $\mu$ L
除タンパク試薬	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
	よく混合する。 室温で 10 分間放置。 遠心分離 2,500rpm 以上、10 分間。 以降の操作はウェル内で行う。		
上清	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
	25 ~ 30℃に置く		
ピクリン酸試薬	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
0.75mol/L 水酸化ナトリウム溶液	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 ~ 30℃で 20 分間放置。 次の 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 (波長:520nm) を測定する。		

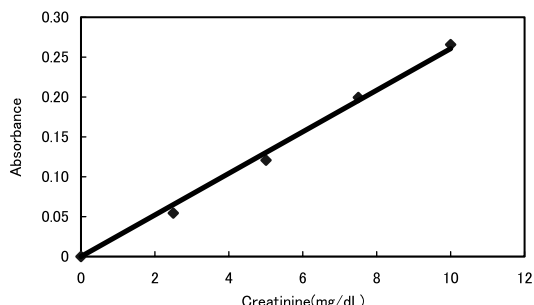
### (2) 用手法

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
試料	検体 0.5mL	標準液 0.5mL	蒸留水又はイオン交換水 0.5mL
除タンパク試薬	3.0mL	3.0mL	3.0mL
	ふり混ぜながら加える。 室温で 10 分間放置。 遠心分離 2,500rpm 以上、10 分間。		
上清	2.0mL	2.0mL	2.0mL
	25 ~ 30℃の水槽につける。		
ピクリン酸試薬	1.0mL	1.0mL	1.0mL
0.75mol/L 水酸化ナトリウム溶液	1.0mL	1.0mL	1.0mL
	25 ~ 30℃の恒温槽中で 20 分間放置。 次の 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: 500 ~ 530nm のフィルター 分光光度計: 520nm		

注: 用手法で測定した場合、50 回用となります。

〔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、0.010～0.020です。
- ・クレアチニン標準液（10mg/dL クレアチニン）を試料として測定した場合の吸光度は、0.400～0.500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%以内にあります。

〔使用上の注意〕

(1) 検体

- ・抗凝固剤のヘパリン、くえん酸塩、しゅう酸塩、EDTA及び解糖防止剤のふっ化ナトリウムは、通常の用量では測定値に影響を与えません。
- ・尿の防腐剤としてはトルエンを使用して下さい。
- ・アスコルビン酸、ビリルビン及び溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
- ・活性メチレン基を有する物質は正誤差を与えます。

(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。
- ・呈色液の極大吸収は480nmにあります。この波長ではピクリン酸の吸収が大きく、ブランク値が高くなるので、520nmの波長を用いて測定します。
- ・反応温度によって吸光度が変化し、測定値にもわずかに差が見られますので、反応温度は一定にして操作して下さい。
- ・多数検体を処理される場合、ピクリン酸試薬と0.75mol/L水酸化ナトリウム溶液を等容量混合した発色試薬をあらかじめ調製しても構いません。この混合発色試薬は調製した当日中に使用して下さい。
- ・0.75mol/L水酸化ナトリウム水溶液はピクリン酸試薬で汚染されると使用できなくなります。操作中、ピペットによる汚染に特に注意して下さい。
- ・アセトンは同様に発色しますので試験管の乾燥その他に使用しない

で下さい。

- ・尿の場合、除タンパク試薬を加えても混濁を認めない場合は遠心分離する必要はありません。
- ・原尿のクレアチニン濃度が10mg/dL以下の場合は、希釈せずに測定して下さい。
- ・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ください。
- ・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、感染の危険があるものとして処理して下さい。

使用期限：製造後30ヶ月

保存条件：2～10℃

包装：500回用

〔参考文献〕

1. Bonsnes, R. W. and Tausky, H. H. : *J. Biol. Chem.*, **158**, 581 (1945).
2. Henry, R. J. : *Clinical Chemistry*, 287 (Harper & Row), New York (1966).

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

1807KA1