

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedure.

Code No. 291-96701

LabAssay™ LDL-Cholesterol (LDL-Cholesterol Kit)

1. Intended use

This kit is a research reagent for measuring LDL-cholesterol.

One of the lipoproteins is LDL, with the cholesterol carried by LDL termed LDL-cholesterol. LDL-cholesterol carries cholesterol produced in the liver throughout the body, and when present in large amounts in the blood, it deposits and accumulates in blood vessel walls, causing atherosclerosis and resulting in myocardial infarction and cerebral infarction. In humans, the normal range of LDL-cholesterol is less than 140 mg/dL, and more than 140 mg/dL is considered to reflect hyper-LDL cholesterolemia.

2. Storage and expiration date

Store at 2°C to 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

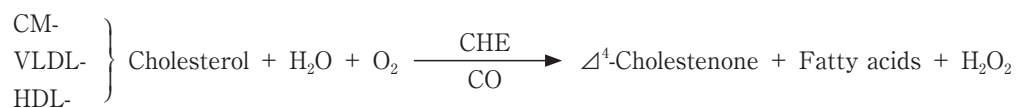
Components		Use Status	Amount
(1)	Pretreatment	Solution Ready for use.	20 mL / 1 vial
(2)	Reacting Solution	Solution Ready for use.	8 mL / 1 vial
(3)	LDL-Cholesterol Standard	Freeze-dried. Use after reconstitution.	2 vial
(4)	Standard Diluent	Solution Ready for use.	10 mL / 1 vial

* For 100 times

4. Principle of the method

The first reaction (elimination of non-LDL-cholesterol)

The block polymer containing hydrophilic and hydrophobic moiety in Pretreatment selectively binds to LDL in the specimens, and protects it from enzyme (CHE, CO) reactions. CHE and CO react with non-LDL lipoprotein [chylomicron (CM), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL)]. Hydrogen peroxide produced by the enzyme reactions with non-LDL cholesterol is decomposed to water by catalase in Pretreatment reagent.



The second reaction (color reaction of LDL-cholesterol)

When Reacting Solution is added, the cholesterol and its derivatives in LDL produce hydrogen peroxide by CHE and CO. Hydrogen peroxide produced by the enzyme reactions with LDL-cholesterol yields a blue color pigment upon oxidative condensation with N-(3-sulfopropyl)-3-methoxy-5-methylaniline (HMMPS) and 4-aminoantipyrine in the presence of peroxidase (POD). The amount of LDL-cholesterol contained in the sample is determined by measuring the absorbance of the blue color.



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

- 96-well microplate (transparent type)
- Micropipette
- Incubator maintained at 37°C
- Plate mixer
- Microplate reader with 600 nm wavelength filter

6. Preparation of reagents and standard solutions

- ① Pretreatment : Ready to use. After opening the bottle, store at 2-10°C and use within one month.
- ② Reacting Solution : Ready to use. After opening the bottle, store at 2-10°C and use within one month.
- ③ Dilution series of standard solution :

LDL-Cholesterol Standard with the correct volume* of deionized water (or distilled water) described in a separate sheet to prepare the original standard solution (300 mg/dL). Then prepare a dilution series of the standard solutions as shown below using the Standard Diluent brought to room temperature.

*Because the volume of deionized water (or distilled water) to be added to the freeze-dried standard differs depending on the lot, see the specified volume in the separate sheet provided. The standard solution containing purified water should be stored at 2-10°C and used within one month. Standard solutions prepared for each concentration should be used immediately and should not be stored.

Example of preparation of dilution series of standard solution

Conc. (mg/dL)	300	150	75.0	37.5	18.8	9.38	0
Standard solution (μL)	50	50*	50*	50*	50*	50*	0
Standard Diluent (μL)	0	50	50	50	50	50	50

*One rank higher standard.

7. Preparation of specimen

Serum/Plasma

- Specimen analysis should be performed immediately after collection.
- Use fresh specimens. Do not use specimens after repeated freeze-thawing as this may denature lipoproteins.
- Anticoagulants such as heparin, citrate and EDTA do not significantly influence the assay when used in normal amounts.
- Hemolysis does not significantly influence the assay.
- Dilute specimen with saline and repeat the assay if the measured value exceeds the measurable range, and multiply the result by the dilution factor.
- When triglyceride in the specimen exceeds 1,000 mg/dL, dilute the specimen with saline and multiply the result by the dilution factor.

8. Assay procedure

Bring reagents to room temperature (20°C- 25°C) before use.

- (1) Dispense 180 μL of the Pretreatment into the 96-well microplate.
- (2) Dispense 5 μL of each concentration of the standard solution into the well in which the standard is to be measured.
- (3) Dispense 5 μL of sample into the well where the sample is to be measured.
- (4) Shake the 96-well microplate on a plate mixer (*①).
- (5) React in a thermostatic bath at 37°C for 10 minutes.
- (6) Remove the 96-well microplate from the thermostatic bath and dispense 60 μL of reaction reagent into each well.
- (7) Shake the 96wells microplate on a plate mixer (*①).
- (8) React in a thermostatic bath at 37°C for 10 minutes.
- (9) Measure the absorbance of each well at 600 nm (reference wavelength, 700 nm (*①)) immediately using a plate reader.

*① Guideline for shaking : 500 rpm-600 rpm for 10 seconds × 3 times.

9. Calculation

- (1) Create a calibration curve for each measurement, with the standard solution concentration (mg/dL) on the X-axis and absorbance on the Y-axis.
- (2) From the calibration curve, read the concentration (mg/dL) 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.

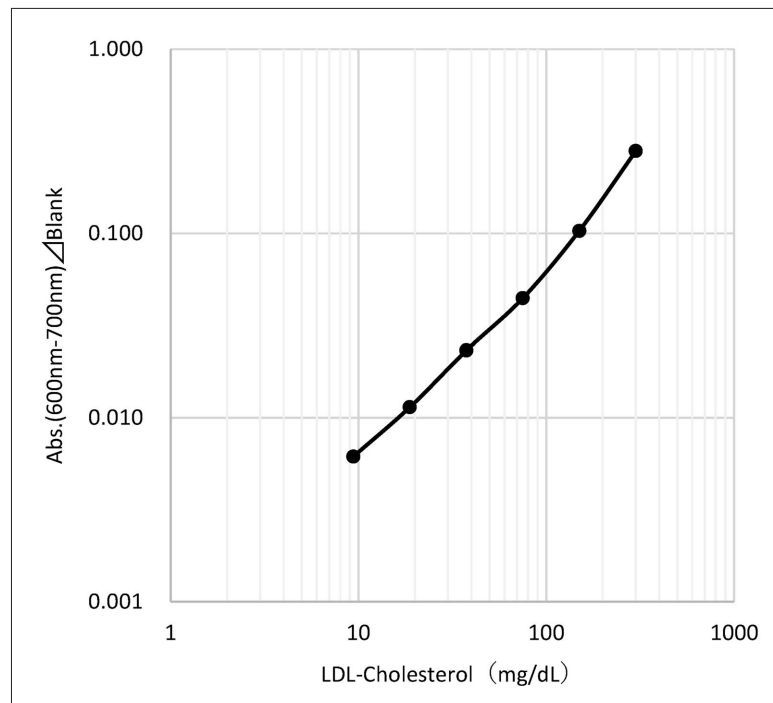
*If the absorbance of the sample deviates from the calibration curve absorbance, prepare the sample to an appropriate

dilution with saline and repeat the assay.

* For arithmetic operations in computer software, we recommend a cubic polynomial, 4- or 5-parameter specification.

10. Standard Curve

• Measuring range : 9.38-300 mg/dL



11. Performance

• Sensitivity

- When a sample subject to a standard dilution is measured, the absorbance is less than 0.030.
- When a standard solution of a specific concentration (LDL-cholesterol 300 mg/dL) is measured as a sample, the absorbance ranges from 0.190 to 0.350.

• Accuracy

- When measuring control serum of known concentration, performance is within $\pm 15\%$ of the known concentration.

Notes

- Store the reagents under the specified conditions. Do not use reagents that have passed the expiration date stated on each reagent container label.
- Do not use reagents that were frozen in error. Such reagents may give false results.
- Operate out of direct sunlight.
- Avoid contamination from the micropipette when collecting reagents.
- For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedure.
- If any reagent comes into contact with the mouth, eyes, or skin, wash off immediately with a large amount of water. Consult a physician if necessary.
- When discarding the reagents, dispose of them according to local or national regulations.
- All devices including reagents and reagent bottles that come into contact with specimens should be considered potentially infectious.
- The Reacting Solution contains 0.09% sodium azide as a preservative. Sodium azide may react with copper or lead plumbing to form explosive compounds. Even though the reagent contains minute quantity of sodium azide, drains should be flushed copiously with a large amount of water, when discarding these reagents.

[References]

- 1) NIH Publication No. 95-3044, Recommendations on Lipoprotein Measurement (1995)
- 2) Japan Atherosclerosis Society : Guidelines for Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases, 5-7 (2002)

LabAssay™ LDL-Cholesterol

[Storage condition] Store the kit at 2°C - 10°C (Do not freeze)

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container

[Cat #] 291-96701

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	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
1600 Bellwood Road	Fuggenstrasse 12
Richmond, VA 23237	D-41468 Neuss
U.S.A.	Germany
Telephone : + 1-804-271-7677	Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 1-804-271-7791	Facsimile : + 49-2131-311100
http://www.wakousa.com	http://www.wako-chemicals.de

本品は研究用試薬です。体外診断用として使用できません。

コードNo. 291-96701

ラボアッセイ™ LDL- コレステロール (LDL-コレステロールキット)

1. はじめに

本キットは LDL- コレステロールを測定する研究用試薬です。

リポタンパクの一つに LDL があり、LDL によって運ばれるコレステロールが LDL- コレステロールと呼ばれています。LDL- コレステロールは肝臓で作られたコレステロールを全身へ運搬し、血中に多く存在すると血管壁に沈着、蓄積し、動脈硬化を起こして心筋梗塞や脳梗塞を発症させます。ヒトの場合、LDL コレステロールの正常範囲は 140mg/dL 未満であり、140mg/dL 以上の場合には高 LDL コレステロール血症とされています。

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

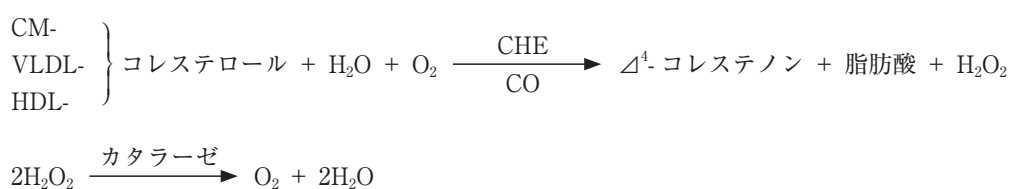
	構成試薬	状態	容量
(1)	前処理液 Pretreatment	溶液 (そのまま使用)	20mL/1 本
(2)	反応試液 Reacting Solution	溶液 (そのまま使用)	8mL/1 本
(3)	LDL- コレステロール標準品 LDL-Cholesterol Standard	凍結乾燥品 (溶解後使用)	2 本
(4)	標準品希釈液 Standard Diluent	溶液 (そのまま使用)	10mL/1 本

※100回テスト用

4. 測定原理

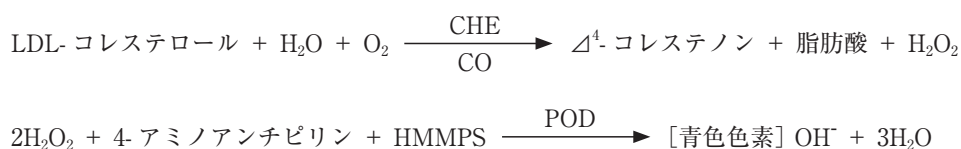
第一反応 (non-LDL コレステロールの消去)

試料中の LDL は前処理液中の親水基と疎水機を有したブロックポリマーによりコレステロールオキシダーゼ (CO)、コレステロールエステラーゼ (CHE) の作用から保護されます。また LDL 以外のリポ蛋白である CM、VLDL、HDL 中のコレステロール (non-LDL コレステロール) は CO、CHE の作用を受けて脂肪酸と Δ^4 -コレステノンに分解され、同時に過酸化水素を生じます。生成した過酸化水素はカタラーゼの作用を受けて水に分解されます。



第二反応 (LDL- コレステロールの発色)

次に反応試液を作用させると、LDL 中のコレステロール類は CO、CHE の作用を受けて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 N-(3-スルホピロプル)-3-メトキシ-5-メチルアニリン (HMMPS) と 4-アミノアンチピリンを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成させます。この青色の吸光度を測定することにより試料中の LDL- コレステロール濃度を求めます。



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
- ・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 (600nm 吸光フィルター)

6. 試薬の調製法

- ① 前処理液：そのままお使い下さい。開封後は2～10℃で1か月以内に使用して下さい。
- ② 反応試液：そのままお使い下さい。開封後は2～10℃で1か月以内に使用して下さい。
- ③ 標準液希釈系：LDL-コレステロール標準品に精製水を別紙記載の指定量*を加え溶解し、標準品原液 (300mg/dL) を調製して下さい。その後、室温化されたキット添付の標準品希釈液で調製して下さい。
*加える精製水の量は別紙をご参照下さい。ロットにより精製水の添加量が異なるため、必ず別紙記載の指定量を加えて下さい。
精製水を加えた標準液は2～10℃で保存し1週間以内に使用して下さい。
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。

標準液の希釈系列調製例

濃度(mg/dL)	300	150	75.0	37.5	18.8	9.38	0
標準液(μL)	50	50*	50*	50*	50*	50*	0
標準希釈液(μL)	0	50	50	50	50	50	50

*ひとつ高濃度の標準溶液

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。
- ・検体は新鮮なものを使用して下さい。凍結融解を繰り返した検体はリポ蛋白が変性していることがありますので使用しないで下さい。
- ・抗凝固剤のヘパリン、クエン酸塩、EDTA は通常使用量では測定値にほとんど影響を与えません。
- ・溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
- ・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。
- ・血清トリグリセライドが1,000mg/dL を超える検体については、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。

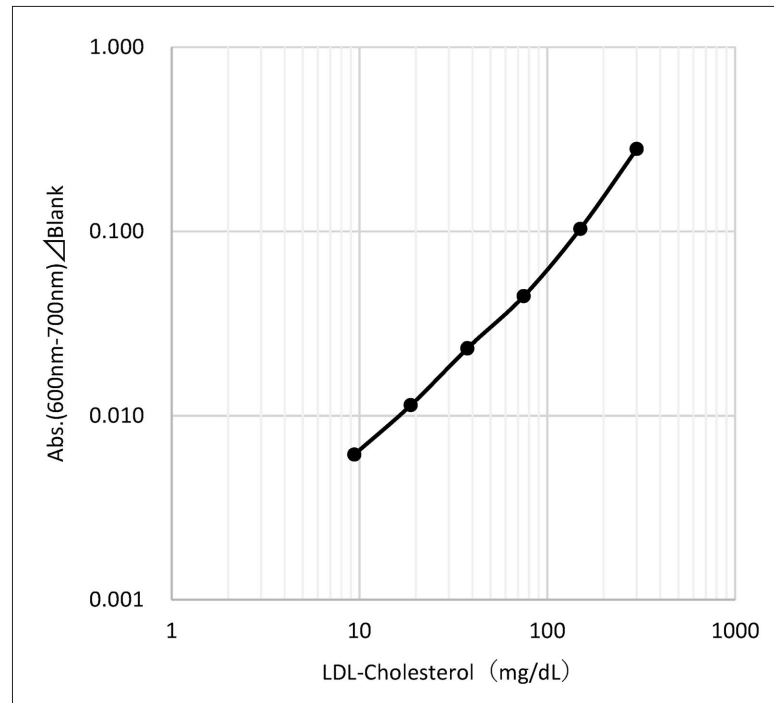
- (1) マイクロプレートに前処理液を 180 μL ずつ分注します。
 - (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 5 μL ずつ分注します。
 - (3) 検体測定ウェルに検体を 5 μL ずつ分注します。
 - (4) マイクロプレート振とう器などを用いて、攪拌 (*①) します。
 - (5) 恒温槽内で 37℃、10 分間反応させます。
 - (6) マイクロプレートを恒温槽からだし、各ウェルに反応試液を 60 μL ずつ分注します。
 - (7) マイクロプレート振とう器などを用いて、攪拌 (*①) します。
 - (8) 恒温槽内で 37℃、10 分間反応させます。
 - (9) 攪拌 (*①) 後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 600nm (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、3 回

9. 計算

- (1) 測定ごとに検量線を作成します。X 軸に標準溶液濃度 (mg/dL)、Y 軸に吸光度の検量線グラフを作成して下さい。
- (2) 検量線より、検体の吸光度に対応する濃度 (mg/dL) 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。
*検体の吸光度が検量線吸光度より外れた場合は、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 パラメーターの仕様をお勧め致します。

10. 標準曲線

・測定範囲：9.38 ～ 300mg/dL



11. キットの性能

・感度

- ・標準希釈液を試料として測定した場合の吸光度は、0.030 未満です。
- ・特定濃度の標準液（LDL-コレステロール 300mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.190 ～ 0.350 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%以内にあります。

注意事項

- ・試薬は指定された保存条件で保管し、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。
- ・直射日光を避けて操作して下さい。
- ・試薬採取の際、ピペットからの汚染に注意して下さい。
- ・本品は体外診断用としては使用できません。
- ・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。
- ・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。
- ・検体と接触した試薬および試薬容器とは、感染の危険性があるものとして処理して下さい。
- ・反応試液は、防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.09% 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。

【参考文献】

- 1) NIH Publication No. 95-3044, Recommendations on Lipoprotein Measurement (1995).
- 2) 日本動脈硬化学会「動脈硬化性疾患診療ガイドライン」, 5-7 (2002).

【測定名】

【所 属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備 考】

【製品名】 ラボアッセイ™ LDL- コレステロール

【和光コード】 291-96701

【英語表記】 LabAssay™ LDL-Cholesterol

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