

LabAssay™ Free Cholesterol

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

This product is a research-use reagent for the quantification of free cholesterol.

In human blood, cholesterol is mainly present in LDL and HDL, with a smaller portion found in VLDL. Approximately 2/3 of total cholesterol exists in esterified form and 1/3 as free form. Free cholesterol refers to cholesterol that is not esterified to fatty acids and plays essential roles in maintaining cell membrane fluidity, signal transduction, and hormone synthesis. Proper regulation of free cholesterol levels is crucial for normal cellular function, and abnormalities can serve as indicators of various diseases. The cholesterol ester ratio is typically 70 - 80%, and a reduction in this ratio is associated with acute and chronic hepatitis, liver cirrhosis, nephrotic syndrome, and chronic inflammatory disorders.

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)	Buffer Solution	Solution	75 mL/1 bottle
(2)	Chromogen Substrate	Freeze-dried	For 75 mL/1 bottle
(3)	Standard Solution	Solution	2 mL/1 bottle

* For 350 tests

4. Principle of the method

When the chromogenic reagent is added to the sample, free cholesterol is oxidized by cholesterol oxidase (CO), producing hydrogen peroxide. The generated hydrogen peroxide induces quantitative oxidative coupling between DAOS and 4-aminoantipyrine in the presence of peroxidase (POD), resulting in the formation of a blue pigment. The free cholesterol concentration in the sample is determined by measuring the absorbance of this blue color.

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 600 nm wavelength filter

6. Preparation of reagents

① Chromogen Reagent :

Prepare Chromogen Reagent by Dissolving 1 bottle of Chromogen Substrate (for 75 mL) to 75 mL of Buffer Solution. After reconstitution, the solution should be stored at 2°C - 10°C and used within 4 weeks.

② Standard Solution : Ready to use. After opening the bottle, store at 2°C - 10°C.

* Standard solutions diluted to each concentration should be used immediately and must not be stored.

Example of preparation of dilution series of standard solution

Standard Concentration (mg/dL)	233	191	100	50	25	10	0
Standard Solution (μL)	Original standard solution : 100	Original standard solution : 50	Original standard solution : 50	Original standard solution : 50	50 *	50 *	—
Water (μL)	—	—	—	50	50	75	50
Well Volume (μL)	25**	20**	10	10	10	10	10

*One rank higher standard solution.

** : The standard solution is typically dispensed at 10 μL per well ; however, 25 μL is used for the 233 mg/dL standard and 20 μL for the 191 mg/dL standard. Accordingly, the displayed values have been corrected to account for the increased volumes.

7. Preparation of specimen

Serum/Plasma

- Analyze specimens immediately after collection.
- The anticoagulant heparin, EDTA · 2Na and citrate does not significantly influence the assay when used in normal amounts.
- Serum samples with a high degree of hemolysis may affect the measurement results. In such cases, collecting the blood sample again is recommended or the results should be used for reference only.
- Chyle and ascorbic acid affect the measured values.
- High levels of bilirubin in the specimen may affect the measured values.
- If the measured value exceeds the measurable range, dilute the sample with saline solution before measurement. Multiply the result by the dilution factor.

8. Assay procedure

Ensure that the reagents are brought up to room temperature (20°C - 25°C) before use.

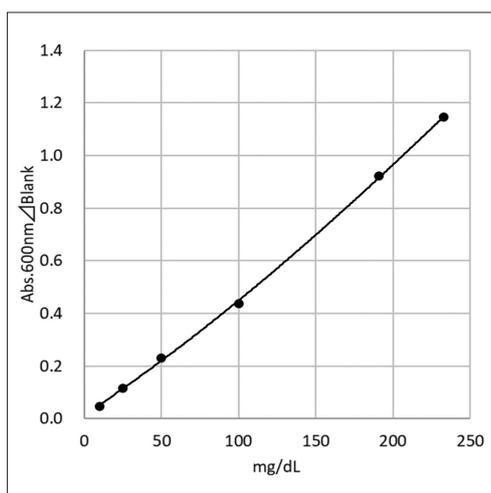
- (1) Dispense 200 μ L of Chromogen Reagent into each well of a 96-well microplate.
 - (2) Dispense 10 μ L of each concentration of standard solution into the well in which the standard is to be measured.
(Dispense the 233 mg/dL and 191 mg/dL standards at the volumes specified in the standard dilution example.)
 - (3) Dispense 10 μ 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 an incubator at 37°C for 20 minutes.
 - (6) Remove the 96-well microplate from the incubator and immediately measure the absorbance of each well at 600 nm using a spectrophotometer for microplates.
- (*①) Guideline for shaking : 600 rpm - 700 rpm for 10 seconds, repeated 3 times.

9. Calculation

- (1) Create a calibration curve for each measurement, with the standard concentration (mg/dL) on the X-axis and absorbance on the Y-axis.
 - (2) From the calibration curve, read the free cholesterol (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 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 4 parameters or 5 parameters.

10. Standard Curve

- Measurement range : 10 - 233 mg/dL



11. Performance

- Accuracy
 - When control serum of known concentration is measured, the measured value is within $\pm 15.0\%$ of the known concentration.
- Repeatability
 - When the same sample is measured simultaneously 5 times, the CV (%) of measured values is 15.0% or less.

Notes

- Avoid using this product at temperatures or reaction times other than those specified.
- The color development is stable, and the absorbance shows almost no change even after standing at room temperature for 1 hour.
- As the pressure inside the Substrate vial is reduced, open it gently so that the contents do not spill out.
- 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.
- When using a pipette, do not aspirate by mouth ; always use a safety pipette filler or equivalent device.
- Open vials carefully to avoid injury from the aluminum cap.
- 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 use the container or accessories included with this product for anything other than their intended purposes.
- 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.
- Be careful regarding contamination when collecting reagents with a pipette.
- Do not mix and use reagents with different lot numbers.
- When disposing of the reagents, dispose of them according to Waste Management and Public Cleansing Law (Waste Disposal and Cleaning Act) and wastewater standards.
- 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).

LabAssay™ Free Cholesterol

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

[Term of validity] Indicated on the label.

[Package] For 350 tests

[Cat #] 297-98501

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>

Group Companies



Distributors



ラボアッセイ™ 遊離コレステロール

1. はじめに

本製品は、遊離コレステロールを測定する研究用試薬です。

ヒト血中のコレステロールは主に LDL や HDL、一部 VLDL に存在し、総コレステロールの約 2/3 がエステル型、1/3 が遊離型として存在します。遊離コレステロールとは脂肪酸と結合していない形態のコレステロールで、細胞膜の柔軟性維持や信号伝達、ホルモン合成に不可欠な役割を担っています。正常な細胞機能には遊離コレステロールの適切なバランスが重要とされ、異常は様々な疾患の指標となります。コレステロールエステル比は通常 70～80% であり、その低下は急性・慢性肝炎、肝硬変症、ネフローゼ症候群、慢性炎症性疾患などに関連しています。

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) 緩衝液	液体	75mL/1本
(2) 発色剤	凍結乾燥品	75mL用
(3) 標準液	液体	2mL/1本

※ 350回テスト用

4. 測定原理

試料に発色試液を作用させると試料中の遊離コレステロールは、コレステロールオキシダーゼ (CO) 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。この青色の吸光度を測定することにより試料中の遊離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
- ・ 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 (600nm 吸光フィルター)

6. 試薬の調製法

① 発色試液：発色剤 1 本を緩衝液 1 本で溶解し、発色試液として下さい。

調製後、2℃～10℃保存で 4 週間使用できます。

② 標準液：そのままお使い下さい。開封後は 2℃～10℃で保存して下さい。

* 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。

標準液の希釈例

標準品濃度 (mg/dL)	233	191	100	50	25	10	0
標準液 (μL)	原液：100	原液：50	原液：50	原液：50	50*	50*	—
精製水 (μL)	—	—	—	50	50	75	50
ウェル分注量 (μL)	25**	20**	10	10	10	10	10

*：ひとつ高濃度の標準溶液

**：標準液のウェル分注量は通常 10 μL ですが、233mg/dL は 25 μL、191mg/dL は 20 μL を使用します。そのため、液量が増加しますので補正した値です。

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。
- ・抗凝固剤の EDTA・2Na、ヘパリン、クエン酸塩は通常の使用量では測定値に影響を与えません。
- ・溶血度の高い血清の場合は測定値に影響を与える可能性があります。採血しなおすか、または参考値程度にとどめて下さい。
- ・乳び、アスコルビン酸は測定値に影響を与えます。
- ・検体中のビリルビンが高い場合は測定値に影響を与える可能性があります。
- ・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。

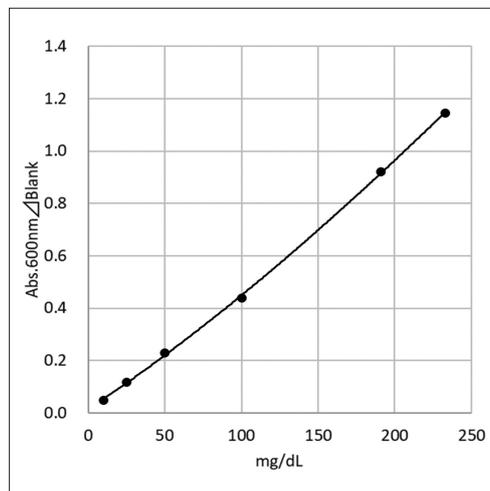
- (1) マイクロプレートに発色試液を 200 μ L ずつ分注します。
 - (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準液を 10 μ L ずつ分注します。
(233mg/dL と 191mg/dL は標準液の希釈例に記載されている試料採取量を分注します。)
 - (3) 検体測定ウェルに検体を 10 μ L ずつ分注します。
 - (4) マイクロプレート振とう器などを用いて、攪拌（*①）します。
 - (5) 恒温槽内で 37℃、20 分間反応させます。
 - (6) マイクロプレートを恒温槽からだし、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 600nm の吸光度を測定します。
- （*①）攪拌の目安は 600rpm ～ 700rpm-10 秒間、3 回

9. 計算

- (1) 測定ごとに標準曲線を作成します。X 軸に標準品濃度（mg/dL）、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遊離コレステロール（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。
- * 検体の吸光度が標準曲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、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：10 ～ 233mg/dL



11. キットの性能

●正確性

- ・既知濃度の管理用血清を測定するとき、既知濃度の $\pm 15.0\%$ 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 15.0% 以下です。

注意事項

- ・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。
- ・呈色は安定で室内温度放置 1 時間後も吸光度にほとんど変化はありません。
- ・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に静かに開けて下さい。
- ・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。
- ・ピペットをご使用の際は直接口で吸わないよう、必ず安全ピペッター等を使用して下さい。

- ・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。
- ・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測定して下さい。
- ・本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。
- ・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ください。
- ・検査にあたって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。
- ・ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・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。
- ・検体、廃液等が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム等の消毒液を用いて拭き取ってください。

【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TM 遊離コレステロール
 【和光コード】 297-98501
 【英語表記】 LabAssayTM Free Cholesterol
 【貯法】 2℃～10℃保存
 【使用期限】 ラベルに記載
 【包装】 350回用

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