

LabAssay™ Cholesterol

Please, read this instruction carefully before use.

1. Introduction

Cholesterol concentration in serum is known to be closely related with production, absorption and dissimulation in liver and intestinal tract, and lipoprotein metabolism in blood.

LabAssay™ Cholesterol is able to measure total cholesterol in mouse and human serum by an enzyme reaction using *N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt (DAOS). It is a simultaneous multi-sample assay format using a microplate, but it measurements can also be made using a test tube.

2. Kit Contents

	Components	State	Amount
(1)	Buffer Solution	liquid	150 mL/1 bottle
(2)	Chromogen Substrate	Freeze dry	For 150 mL/1 bottle
(3)	Standard Solution	liquid	5 mL/1 bottle

※ Assay in a microplate ; 500 tests. Assay in a test tube ; 50 tests.

3. Storage and Expiration

When the complete kit is stored at 2°C - 10°C, the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container.

4. Assay Principle

Cholesterol esters in the sample are decomposed into free cholesterol and fatty acid by cholesterol esterase, when the sample reacts with chromogen reagent. The cholesterol is oxidized with existing free cholesterol by cholesterol oxidase, and simultaneously hydrogen peroxide is produced. The produced hydrogen peroxide let DAOS and 4-Aminoantipyrin oxidize and condensate quantitatively by peroxidase (HRP), which produces a blue pigment. Quantitation of total cholesterol in the sample can be made by measurement of the absorbance.

5. Materials and Apparatuses to be prepared

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

(For Test Tube method)

- Test tube ·Pipette ·Incubator maintaining at 37°C
- Spectrophotometer or colorimeter with 600 nm wavelength filter

6. Preparation of Reagents to be used

① Chromogen Reagent :

Chromogen reagent is prepared by dissolving 1 vial of Chromogen Substrate with 1 vial of Buffer Solution.
After adjustment, it may be stored at 2°C - 10°C for up to 3 weeks.

② Standard Solution

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard Solution.

No.	Provided Standard	Distilled or deionized water	Sample volume	Cholesterol concentration
1	50 μ L	150 μ L	2 μ L	50.0 mg/dL
2	100 μ L	100 μ L	2 μ L	100.0 mg/dL
3	undiluted	—	2 μ L	200.0 mg/dL
4	undiluted	—	4 μ L	397.4 mg/dL ^{*1}
5	undiluted	—	6 μ L	592.2 mg/dL ^{*1}

^{*1} The test sample volume is usually 2 μ L, but 4 or 6 μ L are taken in this case. The cholesterol concentration must be corrected accordingly as indicated in the table above because of volume increasing.

7. Preparation of Samples

- Serum sample should be used immediately after collecting blood.
- Hemolysis causes a slightly increase of the cholesterol value.

- Ascorbic acid and bilirubin may not significantly affect the assay.

8. Procedure

(1) Assay in a Microplate

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

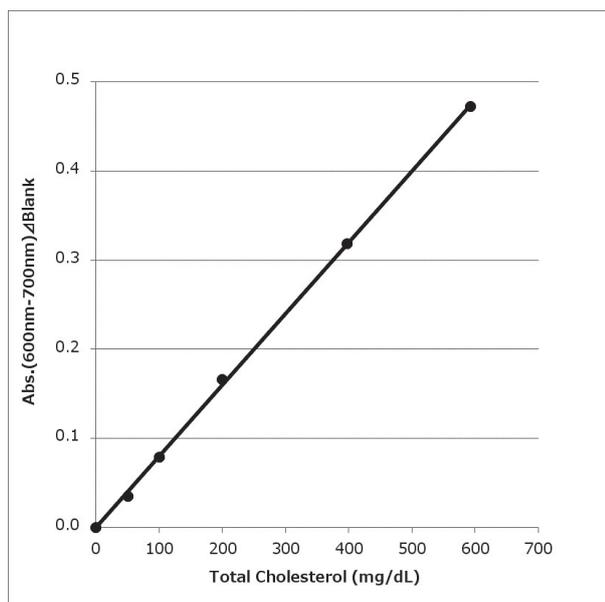
	Test	Standard	Blank
Sample	Serum 2 μ L	Standard solution 2 μ L	–
Chromogen reagent	300 μ L	300 μ L	300 μ L
Mix well and incubate at 37°C for 5 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Main wavelength 600 nm / Sub wavelength 700 nm			

(2) Assay in a Test Tube

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

	Test	Standard	Blank
Sample	Serum 20 μ L	Standard solution 20 μ L	–
Chromogen 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 600 nm wavelength filter Spectrophotometer : Main wavelength 600 nm (subwavelength 700 nm)			

9. Standard Curve



10. Performance

(1) Sensitivity

- The absorbance is below 0.11, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.13 to 0.65, when measuring 200 mg/dL cholesterol as a sample.

(2) Specificity

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

11. Usage Notes

(1) Notes on the assay

- Measure the total cholesterol according to this insert sheet.
- Use measurement apparatuses according to the use manual.
- Keep the provided reagents under the indicated conditions before the expiration. Avoid using frozen reagents. Each of

the reagents should be used immediately after opening, or store them under the indicated conditions.

- Vials should be opened carefully, as the inner is decompressed.
- The chromogen reaction is completed in ca. 2 min. Incubation up to 20 min. may not affect the assay. The reaction is stable and may not significantly affect the absorbance after 2 hours of the reaction.
- This kit is for research use only, but not for diagnostic use.

(2) Safety Precautions

- If a reagent comes into contact with the mouth, eyes, or skin, immediately wash with a lot of water.
- A pipette should be used with a safety pipette filler.
- Vials should be opened carefully.

(3) Waste

- The waste should be processed appropriately according to law.

[Reference]

1. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C.: *Clin. Chem.*, 20, 470 (1974).
2. Richmond, W. : *Clin. Chem.*, 19, 1350 (1973).
3. Richmond, W. : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29 (Suppl.), 126 (1972)

LabAssay™ Cholesterol

[Storage]	Store at 2°C - 10°C
[Expiration date]	Indicated on the label
[Package]	For 500 tests
[Cat #]	293-93601

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

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

Fuggenstrasse 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™ コレステロール

1. はじめに

血清中のコレステロール濃度は、肝及び腸管におけるコレステロールの生成・吸収・異化や血中リポタンパク質代謝と密接に関係しています。

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、マウス血清中の総コレステロール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、ヒト血清中の総コレステロールの定量を行うこともできます。

2. キット構成試薬

	構成試薬	状態	容量
(1)	Buffer Solution 緩衝液	溶液	150mL/1本
(2)	Chromogen Substrate 発色剤	凍結乾燥	150mL用 /1本
(3)	Standard Solution 標準液	溶液	5mL/1本

※マイクロプレート法の場合測定回数は500回、用手法の場合測定回数は50回

3. 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。

4. 測定原理

検体に発色試薬を作用させると、検体中のコレステロールエステル類は、コレステロールエステラーゼにより遊離のコレステロールと脂肪酸に分解します。生成したコレステロールは、既存の遊離型コレステロールと共にコレステロールオキシダーゼにより酸化し、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 (HRP) の作用により DAOS と 4-アミノアンチピリンを定量的に酸化縮合させ、青色色素を生じさせます。この青色色素の吸光度を測定することにより、検体中の総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ウエ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 (検体採取用、試薬分注用)
- ・恒温槽 (37℃)
- ・分光光度計または 600nm のフィルターをもつ比色計

6. 試薬の調製法

①発色試薬：発色剤 (150mL 用) 1本を緩衝液 (150mL) 1本で溶解し、発色試薬とします。調製後、2℃～10℃保存で3週間使用できます。

②標準液調製法

付属の標準液をそのまま、または希釈して標準液 No.1～5 とする。

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 μ L	150 μ L	2 μ L	50.0mg/dL
2	100 μ L	100 μ L	2 μ L	100.0mg/dL
3	原液	—	2 μ L	200.0mg/dL
4	原液	—	4 μ L	397.4mg/dL ^{*1}
5	原液	—	6 μ L	592.2mg/dL ^{*1}

*1 試料の採取量は通常 2 μ L ですが、この場合は 4 μ L 及び 6 μ L を使用します。液量増加のため、数値を補正しています。

7. 検体の調製

全血／血清／血漿検体

- ・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、ビリルビンは測定値にほとんど影響を与えません。

8. 測定操作法

(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下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
試料	血清 2 μ L	標準液 2 μ L	-
発色試薬	300 μ L	300 μ L	300 μ L
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。 主波長 600nm / 副波長 700nm			

(2) 用手法

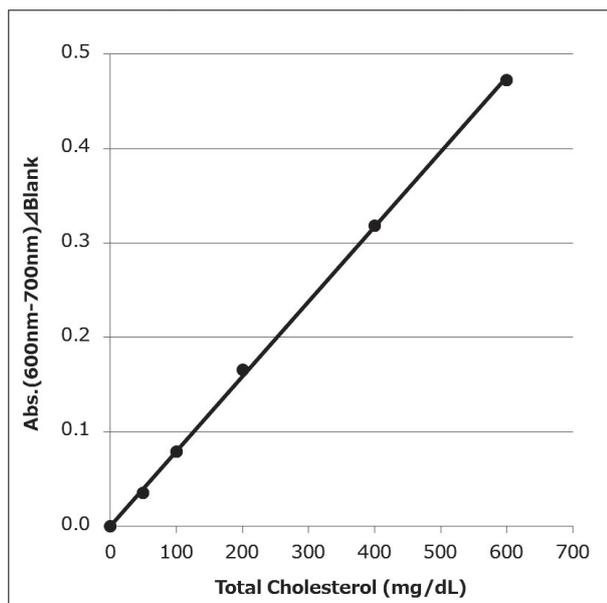
下記に従って、試験管中で反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
試料	血清 20 μ L	標準液 20 μ L	-
発色試薬	3mL	3mL	3mL
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：主波長 600nm / 副波長 700nm			

注：用手法で測定した場合、50 回用となります。

9. 標準曲線

[マイクロプレート法]



10. キットの性能

(1) 感度

- ・精製水を試料として測定した場合の吸光度は、0.11 以下です。
- ・特定濃度の基準液（コレステロール 200mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.13 ~ 0.65 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 \pm 10%以内にあります。

11. 注意事項

(1) 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、機器メーカーにお問い合わせ下さい。
- ・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。また、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保存して下さい。

- ・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。
- ・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。
- ・呈色反応は約2分で終了します。37℃、5分の加温で十分ですが、加温をさらに20分延長しても測定値に影響を与えません。呈色は安定で2時間後も吸光度にほとんど変化はありません。
- ・本品は体外診断用には使用できません。

(2) 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。

◆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等は、感染の危険があるものとして処理して下さい。

〔参考文献〕

1. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C. : *Clin.Chem.*, 20, 470 (1974).
2. Richmond, W. : *Clin. Chem.*, 19, 1350 (1973).
3. Richmond, W. : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29 (Suppl.), 126 (1972).

【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™ コレステロール
【和光コード】	293-93601
【英語表記】	LabAssay™ Cholesterol
【貯法】	2～10℃保存
【使用期限】	ラベルに記載
【包装】	500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