

## LabAssay™ Cholesterol(Cholesterol Oxidase•DAOS method)

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

### (Introduction)

Cholesterol concentration in serum is known to be closely related with production, absorption and dissimilation 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.

### (Kit contents)

	Kit contents	State	Amount
(1)	Buffer Solution 50 mmol/L MES buffer	liquid	150 mL/1bottle
(2)	Chromogen Substrate After reconstitution, Cholesterol esterase                      1.6 units/mL Cholesterol oxidase                        0.31 units/mL Peroxidase (HRP)                         5.2 units/mL DAOS    0.95 mmol/L 4-Aminoantipyrin                         0.19 mmol/L Ascorbate oxidase                         4.4 units/mL	Freeze dry	For 150 mL/1bottle
(3)	Standard Solution Cholesterol 200 mg/dL	liquid	5 mL/1bottle

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

### (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.

### (Materials and apparatuses to be prepared)

- 96wells 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

### (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.

LabAssay™ Cholesterol (Cholesterol Oxidase·DAOS method)

After adjustment, it may be stored at 2-10 °C for up to 3 weeks.

② Standard solution

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard

No.	Provided Standard	Distilled or deionized water	Sample volume	Cholesterol concentration
1	50 µL	150 µL	2 µL	50.0 mg/dL
2	100 µL	100 µL	2 µL	100.0 mg/dL
3	undiluted	–	2 µL	200.0 mg/dL
4	undiluted	–	4 µL	397.4 mg/dL *1
5	undiluted	–	6 µL	592.2 mg/dL *1

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

**[Procedure]**

(1) Assay in a microplate

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

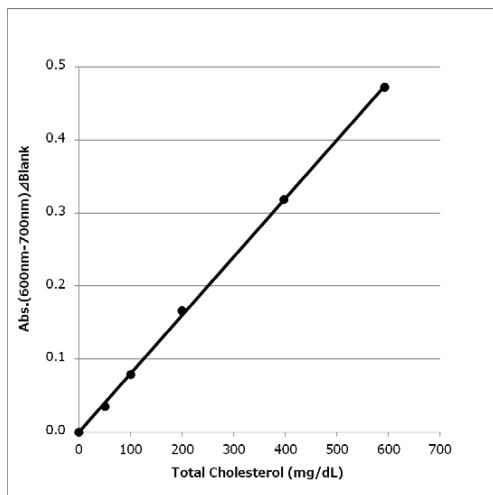
	Test	Standard	Blank
Sample	Serum 2 µL	Standard solution 2 µL	–
Chromogen reagent	300 µL	300 µL	300 µL
	Mix well and incubate at 37 °C for 5 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Main wavelength 600 nm / Sub wavelength 700 nm		

(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 µL	Standard solution 20 µL	–
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 600nm (subwavelength 700nm)		

**[Standard curve]**



**[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.

**[Usage Notes]**

(1) Sample

- 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) Waste

- The waste should be processed appropriately according to law.

LabAssay™ Cholesterol (Cholesterol Oxidase·DAOS method)

**[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 (Cholesterol Oxidase·DAOS method)

[Storage condition] Store the kit at 2 °C~10 °C

[Cat #] 635-50981

## **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

<https://www.fujifilm.com/ffwk/en>

**研究用試薬**

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。

## 『 ラボアッセイ™ コレステロール (コレステロールオキシダーゼ・DAOS法) 』取扱説明書

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

**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。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.キットの保存と使用期限**

2℃～10℃で保存し、凍結させないでください。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 (50 mmol/L MES) 緩衝液	溶液	150 mL/1 本
(2)	発色剤 溶解時 コレステロールエステラーゼ 1.6 units/mL コレステロールオキシダーゼ 0.31 units/mL ペルオキシダーゼ (HRP) 5.2 units/mL DAOS 0.95 mmol/L 4-アミノアンチピリン 0.19 mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ 4.4 units/mL	凍結乾燥	150 mL 用/1 本
(3)	標準液 コレステロール 200 mg/dL	溶液	5 mL/1 本

※マイクロプレート法の場合測定回数は500回、手法の場合測定回数は50回

**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 (600 nm 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
- 恒温槽 (37℃)
- ピペット (検体採取用、試薬分注用)
- 分光光度計または 600 nm 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 (150 mL 用) 1 本を緩衝液 (150 mL) 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 μL	150 μL	2 μL	50.0 mg/dL
2	100 μL	100 μL	2 μL	100.0 mg/dL
3	原液	—	2 μL	200.0 mg/dL
4	原液	—	4 μL	397.4 mg/dL *1
5	原液	—	6 μL	592.2 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 及び 6 μL 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ください。
- ・溶血はわずかに正誤差を与えます。
- ・アルコールビン酸、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、ウエ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	標準液 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検体及び標準液の吸光度を測定する。主波長 600 nm / 副波長 700 nm		

(2) 用手法

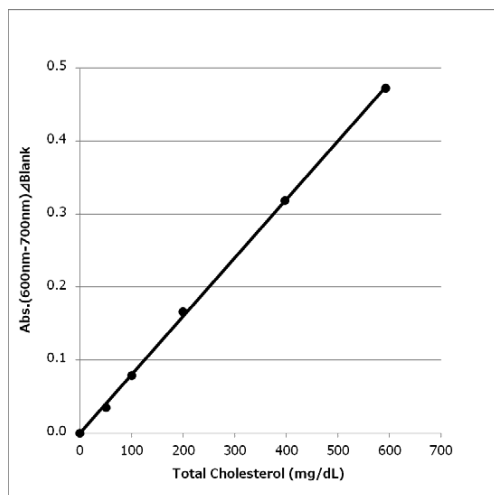
下記に従って、試験管中で反応させてください。

	テスト	スタンダード	ブランク
試料	血清 20 μL	標準液 20 μL	—
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：600 nm のフィルター 分光光度計：主波長 600 nm / 副波長 700 nm		

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

- 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 200 mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.13 ~ 0.65 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± 10 %以内にあります。

### 注意事項

- ◆ 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ください。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ください。なお、詳細については、機器メーカーに問い合わせてください。
  - 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ください。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ください。
  - 誤って凍結させた試薬は使用しないでください。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ください。
  - 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に静かに開けてください。
  - 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。
- ◆ 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ください。
  - 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

## LabAssay™ Cholesterol (Cholesterol Oxidase·DAOS method)

- 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ください。
- 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ください。

### 〔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】

【有効期限】

---

【備考】

---

---

---

---

【製品名】

ラボアッセイ™ コレステロール（コレステロールオキシダーゼ・DAOS法）

【和光コード】

635-50981

【英語表記】

LabAssay™ Cholesterol (Cholesterol Oxidase·DAOS method)

【お問い合わせ先】

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

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>