

<For Research Use Only> Code No. 294-65801 (1,000 Tests)

**Wako** **LabAssay™ Cholesterol**  
(Cholesterol Oxidase · DAOS method)

**[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-sulpropopyl)-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]**

(1)	Buffer (50mmol/L MES Buffer)	150mL	2vials
(2)	Chromogen After reconstitution, Cholesterol esterase 1.6units/mL Cholesterol oxidase 0.31units/mL Peroxidase (HRP) 5.2units/mL DAOS 0.95mmol/L 4-Aminoantipyrin 0.19mmol/L Ascorbate oxidase 4.4units/mL	for 150mL	2vials
(3)	Standard solution (Cholesterol 200mg/dL)	10mL	1vial

**[Materials and apparatuses to be prepared]**

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

**(for test tube method)**

- Test tube
- Pipette
- Spectrophotometer or colorimeter with 600nm wavelength filter

**[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.

**[Preparation of reagents to be used]**

(1) Chromogen reagent :

Chromogen reagent is prepared by dissolving 1 vial of Chromogen with 1 vial of Buffer.

(2) Standard solution

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Provided Std.	Distilled water for dilution	Sampling volume of diluted std.	Uric acid concentration
1	50 μL	150 μL	2 μL	50.0mg/dL
2	100 μL	100 μL	2 μL	100.0mg/dL
3	2 μL	—	2 μL	200.0mg/dL
4	4 μL	—	4 μL	397.4mg/dL
5	6 μL	—	6 μL	592.2mg/dL

**[Procedure]**

(1) Assay in a microplate

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

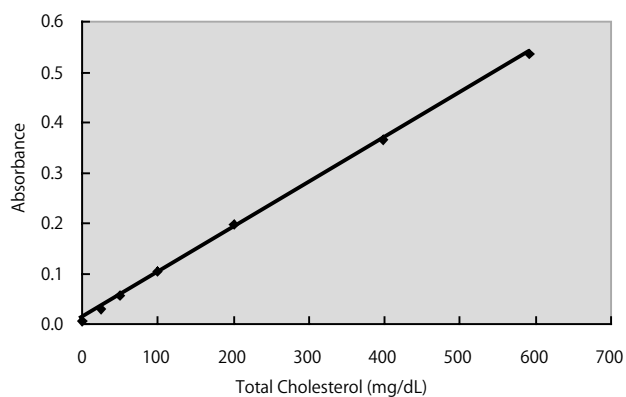
	Test	Standard	Blank
Sample	Serum 2 μL	Standard solution 2 μL	—
Chromogen reagent	300 μL	300 μL	300 μL
	Mix well, and incubate at 37°C for 5 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Main wavelength 600nm / Sub wavelength 700nm		

(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	3mL	3mL	3mL
	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 600nm wavelength filter Spectrophotometer : Main wavelength 600nm (sub wavelength 700nm)		

### [Standard curve]



Microplate reader : SAFIRE (TECAN)

### [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 200mg/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 the law.

**Expiration date** : 1 year after the manufacture

**Storage** : Store at 2 ~ 10°C

**Package** : 1,000 tests

### [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).

## Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

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>

### Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road  
Richmond, VA 23237  
U.S.A.  
Telephone : + 1-804-271-7677  
Facsimile : + 1-804-271-7791  
<http://www.wakousa.com>

### Wako Chemicals GmbH

Fuggerstrasse 12  
D-41466 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 (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法)

### 【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。

### 【キット内容】

(1)	緩衝液 (50mmol/L MES 緩衝液)	150mL	2本
(2)	発色剤 溶解時 コレステロールエステラーゼ 1.6units/mL コレステロールオキシダーゼ 0.31units/mL ペルオキシダーゼ (HRP) 5.2units/mL DAOS 0.95mmol/L 4-アミノアンチピリン 0.19mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ 4.4units/mL	150mL 用	2本
(3)	標準液 (コレステロール 200mg/dL)	10mL	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 (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)
- ・分光光度計または 600nm のフィルターをもつ比色計

### 【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。

### 【試薬の調製法】

- (1) 発色試薬：発色剤 1 本を緩衝液 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	50.0mg/dL
2	100 μL	100 μL	2 μL	100.0mg/dL
3	原液	—	2 μL	200.0mg/dL
4	原液	—	4 μL	397.4mg/dL*
5	原液	—	6 μL	592.2mg/dL*

\* 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。

### 【標準操作法】

- (1) マイクロプレート法

下記に従って、ウェル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 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 600nm / 副波長 700nm		

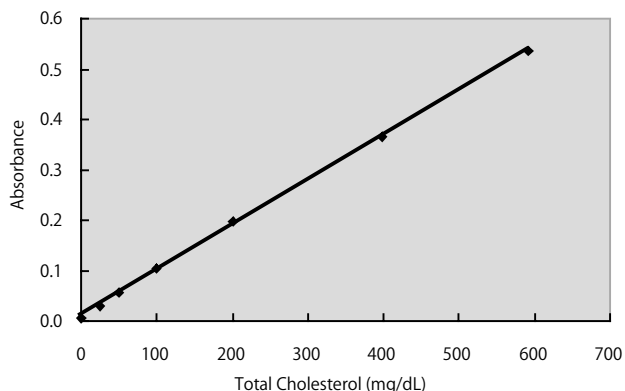
- (2) 用手法

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 μL	標準液 20 μL	—
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、100 回用となります。

### 〔標準曲線〕



マイクロプレートリーダー：SAFIRE (TECAN)

### 〔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。
  - 特定濃度の標準液（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。
- 特異性
  - 既知濃度の管理用血清を測定する時、既知濃度の±10%以内にあります。

### 〔使用上の注意〕

- 検体
  - 採血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。
- 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。
  - 本品は体外診断用としては使用できません。
- 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等を受けて下さい。
  - ピペット使用の際は直接口で吸わないよう、必ず安全ピペット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。
- (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等は、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 1 年

保存条件：2～10℃保存

包装：1,000 回用

### 〔参考文献〕

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

製造発売元

**和光純薬工業株式会社**

大阪市中央区道修町 3 - 1 - 2  
電話 (06) 6203 - 3741 (代表)

0702K01