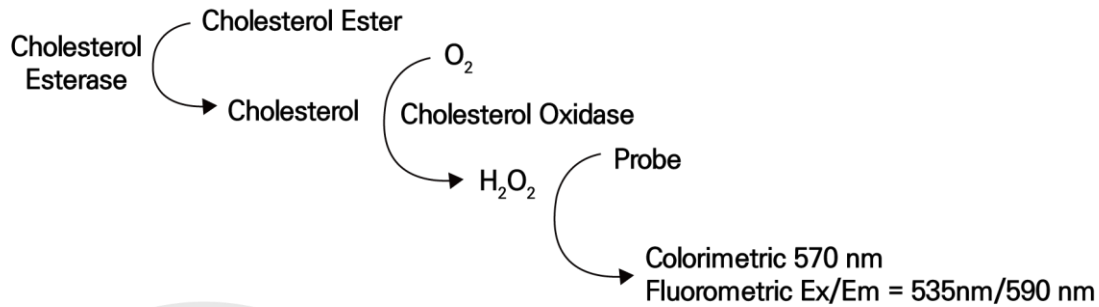


PicoSens™ Total Cholesterol Assay Kit

(Colorimetric / Fluorometric)

BM-CHO-100, 100 assays

제품 원리



BIOMAX PicoSens™ Total Cholesterol Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)에서 Cholesterol ester는 Cholesterol esterase로 인해 가수분해되어 Cholesterol을 형성합니다. 이는 Cholesterol oxidase에 의한 산화 과정에서 발생하는 H₂O₂가 Probe와 반응하여 흡광도 570 nm, 형광 Excitation/Emission=535 nm/590 nm에서 측정되며 이를 통해 Total cholesterol 의 농도를 확인할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Cholesterol Assay Buffer	25 ml	-20°C
Cholesterol Enzyme Mix (Lyophilized)	1 vial	
Cholesterol Esterase (Lyophilized)	1 vial	
Cholesterol Probe	200 µl	
Cholesterol Standard (2 µg/µl)	100 µl	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 1년간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Microtube
- ▶ Microcentrifuge
- ▶ Colorimetric microplate reader (570 nm filter) or
Fluorometric microplate reader (Excitation/Emission = 535 nm/590 nm filter)

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

Cholesterol Assay Buffer

사용 후 4 °C 또는 -20 °C에 보관합니다.

Cholesterol Enzyme Mix

Cholesterol Assay Buffer 220 µl를 넣고 녹입니다. 사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

Cholesterol Esterase

Cholesterol Assay Buffer 220 µl를 넣고 녹입니다. 사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

Cholesterol Probe

사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

Cholesterol Standard

사용하는 동안 Ice에 넣어 사용합니다.

Sample type

- Animal tissues
- Cell culture : Adherent or Suspension cells
- Serum

Sample preparation

Tissue / Cell

Tissues (~100 mg), Cells (~1 X 10⁶)의 경우 Chloroform : Isopropanol : NP-40 (7:11:0.1)로 혼합한 용액 200 µl을 넣고 Homogenizer하여 추출합니다. 완전히 분쇄한 후 Centrifuge로 15,000 x g에서 5~10 min 간 Spin-down 한 후, Organic phase인 Liquid를 따서 Microtube로 옮깁니다. 이 때 Pellet이 들어가지 않도록 주의하여 주십시오. Organic phase에서 Chloroform을 날려 주어야 하므로 50°C에서 Air-dry해줍니다. 약 30 min 간 Air-dry해서 Organic solvent가 완전히 날아 간 후, Cholesterol Assay Buffer 200 µl에 녹여 잘 혼합해 줍니다. 이 때 백탁현상이 나타날 수 있습니다.

Serum

Serum sample의 경우 10배 이상 희석하여 사용하셔야 합니다. 먼저 Cholesterol Assay Buffer에 10배 희석한 후, Sample의 양을 0.5~5 µl/assay로 조절하여 사용합니다.

실험 과정

- * 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행한 후 사용을 권장합니다.
- * Sample의 측정 값이 높은 Background 값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 Sample를 Background control로 준비합니다.
- * Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.

Colorimetric method

Standard preparation

2 µg/µl Cholesterol Standard 20 µl와 Cholesterol Assay Buffer 140 µl를 혼합하여 0.25 µg/µl Standard solution을 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 0.25 µg/µl Standard solution (µl)*	Assay Buffer (µl)*	Final STD Vol. in well (µl/well)	Final STD Amount in well (µg/well)
Blank	0	50	50	0
2	4	46	50	1
3	8	42	50	2
4	12	38	50	3
5	16	34	50	4
6	20	30	50	5

* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate 이상을 권장합니다.

- 준비된 Sample 2~50 µl를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 Cholesterol Assay Buffer로 50 µl가 되도록 조정합니다.
- 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 µl씩 분주합니다.
- Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.

* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 Background control mix를 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Mix	
	Reaction (50 µl/well)	Background Control (50 µl/well)
Assay Buffer	44 µl	46 µl
Enzyme Mix	2 µl	- µl
Esterase	2 µl	2 µl
Probe	2 µl	2 µl

* 50 µl/well 기준으로 Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)

- Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 혼합한 Reaction mix를 50 µl씩 분주합니다.
- 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50 µl를 분주합니다.
- 빛을 차단하여 37°C에서 30 min 동안 Incubation 후 Microplate reader로 흡광도 570 nm에서 측정합니다.

Fluorometric method

Standard preparation

2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Cholesterol Standard 10 μl 와 Cholesterol Assay Buffer 790 μl 를 혼합하여 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Standard solution을 만들어 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Standard solution (μl)*	Assay Buffer (μl)*	Final STD Vol. in well ($\mu\text{l}/\text{well}$)	Final STD Amount in well ($\mu\text{g}/\text{well}$)
Blank	0	50	50	0
2	4	46	50	0.1
3	8	42	50	0.2
4	12	38	50	0.3
5	16	34	50	0.4
6	20	30	50	0.5

* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate 이상을 권장합니다.

- 준비된 Sample 2~50 μl 를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 Cholesterol Assay Buffer로 50 μl 가 되도록 조정합니다.
- 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 μl 씩 분주합니다.
- Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.

* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 Background control mix를 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Mix	
	Reaction (50 $\mu\text{l}/\text{well}$)	Background Control (50 $\mu\text{l}/\text{well}$)
Assay Buffer	45.5 μl	47.5 μl
Enzyme Mix	2 μl	- μl
Esterase	2 μl	2 μl
Probe	0.5 μl	0.5 μl

* 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 기준으로 Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)

- Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 혼합한 Reaction mix를 50 μl 씩 분주합니다.
* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50 μl 를 분주합니다.
- 빛을 차단하여 37°C에서 30 min 동안 Incubation 후 Fluorometric microplate reader로
Excitation/Emission = 535 nm/590 nm 에서 측정합니다.

Free cholesterol 측정

- Cholesterol esterase가 존재하는 반응에서는 Total cholesterol (Cholesterol과 Cholesteryl esters)을 분석하며 Cholesterol esterase가 존재하지 않는 반응으로 통해 Free cholesterol을 분석할 수 있습니다.
- Cholesteryl esters는 Total cholesterol 분석 값과 Free cholesterol 분석 값의 차로 구합니다.

Free Cholesterol Reaction mix

Esterase는 Cholesteryl esters를 Free cholesterol로 가수분해 합니다. Sample에서 Free cholesterol만 선택적으로 측정하고 싶다면 Esterase를 첨가하지 않고 Cholesterol Assay Buffer 2 μ l로 대체하십시오. Esterase는 Standard curve well에는 반드시 첨가하여야 합니다.



결과 분석

- **Cholesterol molecular weight: 386.15 g/mol (1 µg/µl = 100 mg/dl)**

- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.

- 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.

* Sample background control을 설정한 경우 Sample의 측정값에서 Sample background control 측정값과 Blank 측정 값을 모두 뺍니다.

- Standard curve에 Sample의 OD 값을 대입하여 구한 Cholesterol의 양으로 다음 식을 이용하여 Sample 내 Cholesterol의 농도를 구합니다.

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = B/V \times D$$

C : Sample 의 Cholesterol 농도 (µg/µl)

B : 측정 Well 의 Cholesterol 양 (µg)

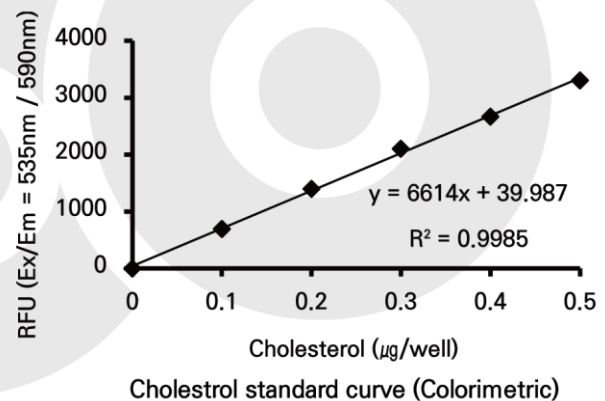
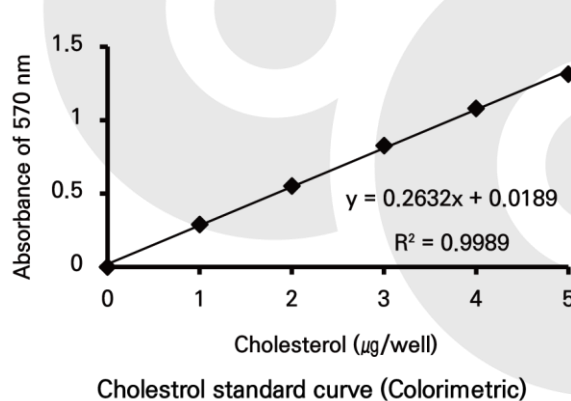
V : Well 에 분주한 Sample 의 Volume (µl)

D : Sample 희석 배율

- **Total cholesterol (Free cholesterol + Cholesteryl ester)** : Reaction mix 를 사용한 측정값

- **Free cholesterol** : Free cholesterol reaction mix 를 사용한 측정값

- **Cholesteryl ester** : Total cholesterol 측정값 – Free cholesterol 측정값



Related products

- BM-CDL-100	PicoSens™ HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)
- BM-FFA-100	PicoSens™ Free Fatty Acid Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BM-TGR-100	PicoSens™ Triglyceride Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BM-GLY-100	PicoSens™ Free Glycerol Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BO-TBR-200	OxiTec™ TBARS Assay kit (Colorimetric)

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note