

# **EZ- HDL, LDL/VLDL Assay Kit**

Metabolism assay kit  
(Colorimetric/Fluorometric)

Cat. No. DG-CHO100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

## ▪ Product Description

HDL (High-Density Lipoprotein) 콜레스테롤 및 LDL (Low-Density Lipoprotein) 콜레스테롤은 다양한 질병에서 중심적인 역할을 합니다. 낮은 수준의 HDL과 높은 수준의 LDL은 심혈관 위험 증가와 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있습니다.

EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit 는 혈청 sample의 LDL 및 VLDL (Very Low-Density Lipoprotein)로부터 HDL을 편리하게 분리한 후 간단하게 HDL 및 LDL/VLDL를 정량화 할 수 있는 방법을 제공합니다.

분석에서 Cholesterol Oxidase (콜레스테롤 산화 효소)는 free cholesterol을 특이적으로 인식하여 흡광 ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) 및 형광 ( $\text{Ex/Em} = 538/590 \text{ nm}$ )을 생성하는 probe와 반응합니다. Cholesterol Esterase 는 cholesteryl ester를 free cholesterol로 가수분해하므로, cholesterol ester와 free cholesterol은 cholesterol esterase 존재 및 부재하에 별도로 검출 할 수 있습니다.

## ▪ Contents and Storage Conditions

| Component   | 100 assay         | Cap Cord | Storage |
|---|-------------------|----------|---------|
| Cholesterol Assay buffer                            | 25mL              | -        | -20°C   |
| 2X LDL/VLDL buffer                                  | 10mL              |          |         |
| Cholesterol Enzyme mix (Lyophilized)                | 1 vial            | Red      | -20°C   |
| Cholesterol esterase (Lyophilized)                  | 1 vial            | Blue     | -20°C   |
| Cholesterol Probe                                   | 200 $\mu\text{L}$ | Yellow   | -20°C   |
| Cholesterol Standard (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | 100 $\mu\text{L}$ | Green    | -20°C   |

\* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안 됩니다.

\* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 100 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 100개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이 중 standard, blank, sample당 duplication 처리 등을 고려하면 실제 테스트 가능한 시료의 숫자는 20~40 samples의 범위에 있습니다. 제품설명서를 자세히 검토하고, 테스트하고자 하는 sample의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

## ▪ Preparation of Reagent

| Component                            | Preparation  | Storage and Stability                             |
|--------------------------------------|--|---|
| Cholesterol Enzyme mix (Lyophilized) | 220 $\mu\text{l}$ Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다. | 혼합한 용액은 -20 °C에서 2개월 동안 안정합니다.                    |
| Cholesterol esterase (Lyophilized)   | 220 $\mu\text{l}$ Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다. | 혼합한 용액은 -20 °C에서 2개월 동안 안정합니다.                    |
| Cholesterol Probe                    | 상온에서 충분히 녹여서 사용합니다.  | 사용하고 남은 용액은 -20 °C에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오. |

\* Assay buffer는 실험 전 상온에서 충분히 warming up 한 후 사용합니다.

차가운 상태의 buffer 사용시 enzyme 활성이 억제되어 측정결과에 영향을 줄 수 있습니다.

## ▪ General Protocol

### 1. Separation of HDL and LDL/VLDL

- ① 2X LDL/VLDL buffer 100  $\mu\text{l}$ 와 serum sample 100  $\mu\text{l}$ 를 microtube에 넣고 섞어줍니다.
- ② 실온에서 10분간 반응합니다.
- ③ 2000xg에서 10분간 원심분리합니다.
- ④ 원심분리 후 상층액은 HDL이며, 침전물은 LDL/VLDL 입니다.

\* 주의사항 : 원심분리 후 상층액이 불투명한 경우 다시 원심 분리하여 사용합니다.

그래도 상층액이 불투명하다면 sample을 PBS와 1:1 로 희석하여 위 과정을 다시 진행합니다.

- ⑤ 상층액은 새로운 tube에 옮기어 HDL 측정에 사용합니다.
- ⑥ LDL/VLDL을 측정하기 원한다면 상층액을 제거한 tube를 다시 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 최대한 제거한 후 침전물을 200  $\mu\text{l}$  PBS로 녹여 사용합니다.

### 2. Sample preparation

준비된 sample을 96 well plate에 2-50  $\mu\text{l}$  넣은 후, 최종 volume은 assay buffer로 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 조정합니다. (n≥2)

- 1) 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정 값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.

2) 높은 background를 갖는 시료의 경우 측정에 사용한 동일 양의 시료를 background control로 준비합니다.

3) 샘플에 포함된 여러 화합물들이 반응을 방해할 수 있으므로 보다 정확한 실험을 위해 cholesterol standard 2  $\mu\text{g}$ 을 spike sample 처리하여 결과를 보정할 것을 권합니다.

### 3. Standard preparation

#### 1) Colorimetric method

2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Cholesterol Standard 20  $\mu\text{l}$ 와 assay buffer 140  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  standard solution을 만듭니다. 이를 96 well plate에 0, 4, 8, 12, 16 20  $\mu\text{l}$ 를 각각 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50  $\mu\text{l}$ 로 조정하면 각 plate에 0, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 standard set가 만들어집니다.

| Standard No. | Volume of 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cholesterol Standard | Volume of Assay buffer | Final standard volume in well | Final standard cholesterol Conc. ( $\mu\text{g}/\text{well}$ ) |
|--------------|---|------------------------|-------------------------------|--|
| 1            | 0 $\mu\text{l}$   | 50 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0  |
| 2            | 4 $\mu\text{l}$   | 46 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 1  |
| 3            | 8 $\mu\text{l}$   | 42 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 2  |
| 4            | 12 $\mu\text{l}$  | 38 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 3  |
| 5            | 16 $\mu\text{l}$  | 34 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 4  |
| 6            | 20 $\mu\text{l}$  | 30 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 5  |

\* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.

\* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

#### 2) Fluorometric method

2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Cholesterol Standard 10  $\mu\text{l}$ 와 assay buffer 790  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  standard solution을 만듭니다. 이를 96 well plate에 0, 4, 8, 12, 16 20  $\mu\text{l}$ 를 각각 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50  $\mu\text{l}$ 로 조정하면 각 plate에 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 standard set가 만들어집니다.

| Standard No. | Volume of 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cholesterol Standard | Volume of Assay buffer | Final standard volume in well | Final standard cholesterol Conc. ( $\mu\text{g}/\text{well}$ ) |
|--------------|--|------------------------|-------------------------------|--|
| 1            | 0 $\mu\text{l}$  | 50 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0  |
| 2            | 4 $\mu\text{l}$  | 46 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0.1  |
| 3            | 8 $\mu\text{l}$  | 42 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0.2  |
| 4            | 12 $\mu\text{l}$   | 38 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0.3  |
| 5            | 16 $\mu\text{l}$   | 34 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0.4  |
| 6            | 20 $\mu\text{l}$   | 30 $\mu\text{l}$       | 50 $\mu\text{l}$              | 0.5  |

\* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.

\* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

#### 4. Reaction mixture preparation

1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay양을 계산하여 여유 있게 reaction mix를 준비합니다.

##### 1) Colorimetric method : Total Cholesterol

| Components               | Reaction mixture | Background mixture |
|--------------------------|------------------|--------------------|
| Cholesterol Assay buffer | 44 $\mu\ell$     | 46 $\mu\ell$       |
| Cholesterol Enzyme mix   | 2 $\mu\ell$      | -                  |
| Cholesterol esterase     | 2 $\mu\ell$      | 2 $\mu\ell$        |
| Cholesterol Probe        | 2 $\mu\ell$      | 2 $\mu\ell$        |
| Total                    | 50 $\mu\ell$     | 50 $\mu\ell$       |

\* Free Cholesterol Reaction Mix : Esterase는 Cholesteryl ester를 free cholesterol로 가수 분해합니다. 샘플에서 free cholesterol만 선택적으로 측정하고 싶으면 esterase를 첨가하지 말고 assay buffer 2  $\mu\ell$ 로 대체하십시오. (Esterase는 Standard curve well에는 반드시 첨가하여야 합니다.)

##### 2) Fluorometric method : Total Cholesterol

| Components               | Reaction mixture | Background mixture |
|--------------------------|------------------|--------------------|
| Cholesterol Assay buffer | 45.6 $\mu\ell$   | 47.6 $\mu\ell$     |
| Cholesterol Enzyme mix   | 2 $\mu\ell$      | -                  |
| Cholesterol esterase     | 2 $\mu\ell$      | 2 $\mu\ell$        |
| Cholesterol Probe        | 0.4 $\mu\ell$    | 0.4 $\mu\ell$      |
| Total                    | 50 $\mu\ell$     | 50 $\mu\ell$       |

\* Free Cholesterol Reaction Mix : Esterase는 Cholesteryl ester를 free cholesterol로 가수 분해합니다. 샘플에서 free cholesterol만 선택적으로 측정하고 싶으면 esterase를 첨가하지 말고 assay buffer 2  $\mu\ell$ 로 대체하십시오. (Esterase는 Standard curve well에는 반드시 첨가하여야 합니다.)

#### 5. Reaction mixture를 Cholesterol standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50 $\mu\ell$ 씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

\* background control 을 준비한 경우에는 background control well에 background mixture를 넣어줍니다.

#### 6. Plate를 빛이 차단된 37 °C에서 30분간 반응시킨 후, 부드럽게 shaking 하여 microplate reader로 측정합니다.

1) Colorimetric : 570 nm

2) Fluorometric : (Excitation/Emission): 535 nm / 595 nm

## ■ Calculation

1. 모든 측정값에서 standard 1 값을(blank) 빼줍니다.
  2. 각 standard well과 sample well의 duplicate 측정값을 평균합니다.
  3. Cholesterol standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.  
(Cholesterol standard Vs OD<sub>570nm</sub> )
  4. Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 sample내의 Cholesterol 양을 계산하여 줍니다.
- \* Background control을 설정한 경우 sample 측정값 에서 background control 측정값을 빼 수치를 대입하여 Cholesterol 양을 계산하여 줍니다.
5. 4에서 계산된 sample 내의 Cholesterol 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Cholesterol 의 농도를 계산하여 줍니다.

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

B : Standard curve로부터 구한 측정 well의 Cholesterol 의 양( $\mu\text{g}$ )

V: well에 분주한 시료의 양 ( $\mu\text{l}$ )

D: 샘플 희석배율 (2배희석한경우 x1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)

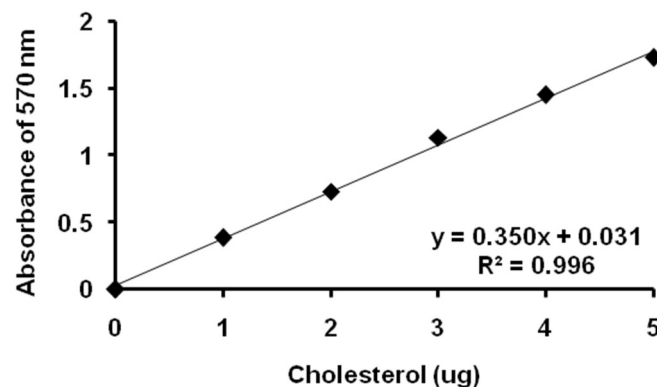
\* Cholesterol Molecular Weight: 386.6; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  = 100 mg/dL.

Total Cholesterol (Free cholesterol + Cholesteryl ester)

: Total Cholesterol Reaction Mix를 사용한 측정값

Free Cholesterol : Free Cholesterol Reaction Mix를 사용한 측정값

Cholesteryl Ester : Total Cholesterol 측정값 – Free Cholesterol 측정값



Cholesterol standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

※ Spike sample : 샘플내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들어 Cholesterol이 실제로는 2 ng이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 1.6 ng (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다. 이러한 현상을 보정하기 위해 샘플과 별도로 샘플에 일정량의 Cholesterol (standard 물질 사용)을 첨가한 well을 따로 설정하여 그 결과 값을 통해 실제 샘플의 농도를 보정하는 방법입니다. 이 실험에서 spike sample을 이용한 경우 위 농도 계산식은 다음과 같이 정리됩니다.

**샘플 내 Cholesterol 의 양(B) =  $OD1 / (OD2 - OD3) \times \text{Cholesterol spike } (\mu g)$**

OD1 : Sample 의 OD값 (blank corrected)

OD2 : Spiked sample의 OD값 (blank corrected)

OD3 : Sample의 OD값 (blank corrected)

Cholesterol spike: 샘플에 넣은 Cholesterol spike의 양

## ▪ Related Product

|                                   | Products  | Catalog No. | Assay     |
|-----------------------------------|---|-------------|-----------|
| <b>Oxidative Stress Assay Kit</b> | EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)                | DG-SOD400   | 400 Assay |
|                                   | EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)                               | DG-GLU200   | 200 Assay |
|                                   | EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)                     | DG-CAT400   | 400 Assay |
|                                   | EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-PER500   | 500 Assay |
|                                   | EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)                | DG-TBA200   | 200 Assay |
|                                   | EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)          | DG-TAC200   | 200 Assay |
|                                   | EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)                          | DG-DPH400   | 400 Assay |
|                                   | EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)                          | DG-ABT400   | 400 Assay |
|                                   | EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)                    | DG-GPX100   | 100 Assay |
| <b>Metabolism Assay Kit</b>       | EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)                                   | DG-LAC100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)                      | DG-ACE100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)                             | DG-ASC100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)                          | DG-ATP100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)              | DG-FFA100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)                | DG-FGC100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)                      | DG-GCS100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)                | DG-CHO100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)            | DG-TSC100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)  | DG-TGC100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)                              | DG-NO500    | 500 Assay |
|                                   | EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)                            | DG-COL100   | 100 Assay |
|                                   | EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)                                   | DG-ETH100   | 100 Assay |



