EZ-Total Cholesterol Assay Kit

Metabolism assay kit

(Colorimetric/Fluorometric)

Cat. No. DG-TSC100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

DoGenBio Co., Ltd.

▪ Product Description

Total Cholesterol Assay kit는 free cholesterol과 cholesteryl esters를 각각 또는 total로 흡광 (colorimetric) 및 형광 (fluorometric) 방법을 통하여 정량 분석할 수 있는 제품입니다.

혈액의 대부분의 cholesterol은 cholesteryl esters의 형태로 존재하는데 이는 cholesterol esterase에 의해 cholesterol로 가수분해 됩니다. Cholesterol은 다시 cholesterol oxidase에 의해 산화되면서 부산물로 H_2O_2를 생성하고 이는 Cholesterol probe와 반응하여 발색 (최대 흡광도 570 nm) 및 형광 (Ex/Em = 535/590 nm)을 일으킵니다.

Cholesterol esterase가 존재 하는 반응에서는 total cholesterol (cholesterol + cholesteryl esters)을 분석하며 cholesterol esterase가 존재하지 않는 반응을 통해서는 free cholesterol을 분석할 수 있습니다. Cholesteryl ester는 total cholesterol 분석 값과 free cholesterol 값의 차로 분석이 가능합니다.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage
Cholesterol Assay buffer	25㎖	-	-20℃
Cholesterol Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20℃
Cholesterol esterase (Lyophilized)	1 vial	Blue	-20℃
Cholesterol Probe	200㎕	Yellow	-20℃
Cholesterol Standard (2 ㎍/㎕)	100㎕	Green	-20℃

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* 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.

▪ Sample type

동물 조직, 배양세포, 혈청 등의 샘플에서 cholesterol의 농도를 측정하고 이를 통해 지질 대사과정을 분석할 수 있습니다.

▪ Preparation of Reagent

Component	Preparation	Storage and Stability
Cholesterol Enzyme mix (Lyophilized)	220 ㎕ Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20 ℃에서 2개월 동안 안정합니다.
Cholesterol esterase (Lyophilized)	220 ㎕ Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20 ℃에서 2개월 동안 안정합니다.
Cholesterol Probe	상온에서 충분히 녹여서 사용합니다.	사용하고 남은 용액은 -20 ℃에 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. Sample preparation

준비된 sample을 96 well plate에 2-50 ㎕ 넣은 후, 최종 volume은 assay buffer로 50 ㎕가 되도록 조정합니다. (n≥2)

1) Serum sample : 0.5 ~ 5 ㎕를 cholesterol assay buffer로 10배 희석하여 사용합니다.

2) Cell or Tissue (non-aqueous samples)

① ~ 1 x 10^6 cells 또는 ~ 10 mg tissue sample을 준비합니다.
* 더 많은 양의 sample을 테스트할 경우는 각 단계에서 시약을 샘플 양에 맞게 비례적으로 증가시키면 됩니다.
② PBS를 이용하여 sample을 washing 해줍니다.
③ sample 에 chloroform : isopropanol : NP-40 (7:11:0.1) 용액 200 ㎕ 을 넣고 얼음에서 균질화 (homogenization) 합니다.
④ 15,000xg로 5-10분간 원심분리 합니다.
⑤ Pellet을 제외한 모든 liquid (organic phase)를 다른 tube에 옮기고 50 ℃에서 건조시켜 chloroform을 제거하고 미량의 유기 용매를 제거하기 위해 시료를 30분간 vacuum dry합니다.
⑥ 건조된 lipid에 cholesterol assay buffer 200 ㎕를 넣고 용액이 탁해질 때까지 sonication 또는 vortexing 등으로 잘 녹여 혼합합니다.

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

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

5) 샘플에 포함된 여러 화합물들이 반응을 방해할 수 있으므로 보다 정확한 실험을 위해 cholesterol standard 2 ㎍을 spike sample 처리하여 결과를 보정할 것을 권장합니다.

2. Standard preparation

1) Colorimetric method

2 ㎍/㎕ Cholesterol Standard 20 ㎕와 assay buffer 140 ㎕를 혼합하여 0.25 ㎍/㎕ standard solution을 만듭니다. 이를 96 well plate에 0, 4, 8, 12, 16, 20 ㎕ 각각 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50 ㎕로 조정하면 각 plate에 0, 1, 2, 3, 4, 5 ㎍/well의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 0.25㎍/㎕ cholesterol Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard cholesterol Conc. (㎍/well)
1	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

* 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 ㎍/㎕ Cholesterol Standard 10 ㎕와 assay buffer 790 ㎕를 혼합하여 0.025 ㎍/㎕ standard solution을 만듭니다. 이를 96 well plate에 0, 4, 8, 12, 16, 20 ㎕ 각각 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50 ㎕로 조정하면 각 plate에 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ㎍/well의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 0.025 ㎍/㎕ cholesterol Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard cholesterol Conc. (㎍/well)
1	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

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.
* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

3. Reaction mixture preparation

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

T. 070-7727-0456 F. 02-855-1550 www.dogenbio.com

1) Colorimetric method : Total Cholesterol

Components	Reaction mixture	Background mixture
Cholesterol Assay buffer	44 ㎕	46 ㎕
Cholesterol Enzyme mix	2 ㎕	-
Cholesterol esterase	2 ㎕	2 ㎕
Cholesterol Probe	2 ㎕	2 ㎕
ToTal	50 ㎕	50 ㎕

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

2) Fluorometric method : Total Cholesterol

Components	Reaction mixture	Background mixture
Cholesterol Assay buffer	45.6 ㎕	47.6 ㎕
Cholesterol Enzyme mix	2 ㎕	-
Cholesterol esterase	2 ㎕	2 ㎕
Cholesterol Probe	0.4 ㎕	0.4 ㎕
ToTal	50 ㎕	50 ㎕

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

4. Reaction mixture를 Cholesterol standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50㎕씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

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

5. Plate를 빛이 차단된 37 ℃에서 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_{570nm})

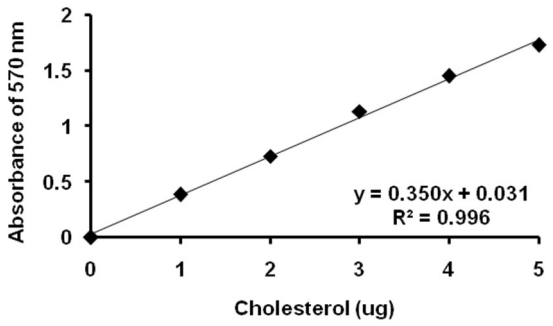
4. Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 sample내의 Cholesterol 양을 계산하여 줍니다.
   * Background control을 설정한 경우 sample 측정값 에서 background control 측정값을 뺀 수치를 대입하여 Cholesterol 양을 계산하여 줍니다.

5. 4에서 계산된 sample 내의 Cholesterol 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Cholesterol 의 농도를 계산하여 줍니다.

샘플 내 Cholesterol 농도 (C) = B/V x D (㎍/㎕)

B : Standard curve로부터 구한 측정 well의 Cholesterol 의 양(㎍)
V : well에 분주한 시료의 양 (㎕)
D : 샘플 희석배율 (2배희석한경우 x1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)

* Cholesterol Molecular Weight: 386.6; 1 µg/µl = 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.

T. 070-7727-0456 F. 02-855-1550 www.dogenbio.com

※ 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)를 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) x Cholesterol spike (㎍)

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
Oxidative Stress Assay Kit	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
Metabolism Assay Kit	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/VDL 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