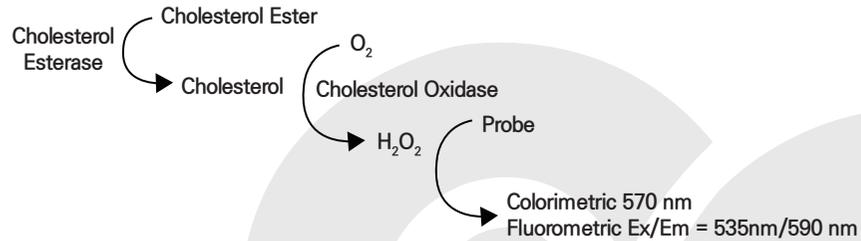


PicoSens™ Total Cholesterol Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)

(BM-CHO-100, 100 assays, Store at -20°C)

실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Total Cholesterol Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)에서 Cholesterol ester는 Cholesterol esterase로 인해 가수분해되어 Cholesterol를 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 cholesterol의 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 준비사항 및 보관방법

- ▶ 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 날아간 후, Cholesterol Assay Buffer 200 µL를 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 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행한 후 사용을 권장합니다.
- * Sample의 측정 값이 높은 Background 값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 Sample 를 Background control 로 준비합니다.
- * Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.

Colorimetric method

Standard preparation

2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Cholesterol Standard 20 μl 와 Cholesterol Assay Buffer 140 μl 를 혼합하여 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Standard solution을 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 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	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 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	44 μl	46 μl
Enzyme Mix	2 μl	- μl
Esterase	2 μl	2 μl
Probe	2 μl	2 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 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 μl 로 대체하십시오. Esterase는 Standard curve well에는 반드시 첨가하여야 합니다.

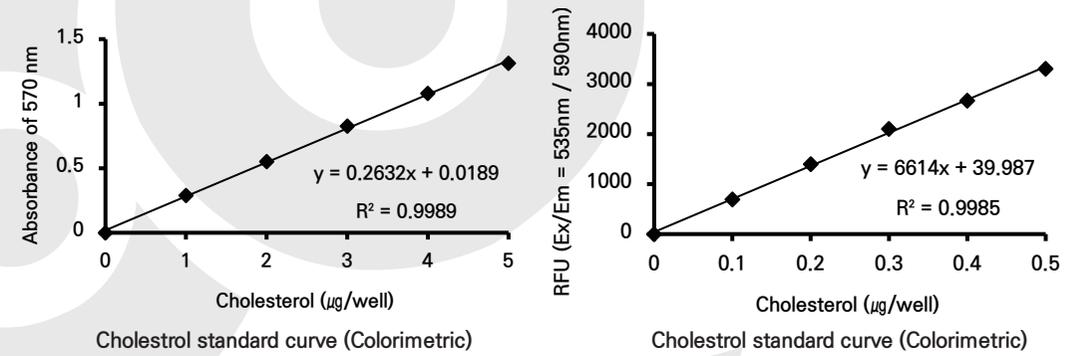
결과 분석

- **Cholesterol molecular weight: 386.15 g/mol (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ = 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 : Sample의 Cholesterol 농도 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- B : 측정 Well의 Cholesterol 양 (μg)
- V : Well에 분주한 Sample의 Volume (μl)
- D : Sample 희석 배율

- **Total cholesterol (Free cholesterol + Cholesteryl ester)** : Reaction mix를 사용한 측정값
- **Free cholesterol** : Free cholesterol reaction mix를 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.