J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 2, pp. 148~153 (2009)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

형광 크로마토그래피에 의한 콜레스테롤 측정법의 개발

오상욱*
전북대학교 사범대학 과학교육학부

Development of Total Cholesterol Detection System by Fluorescence Chromatography

Sang Wook Oh*
Division of Science Education, Institute of Fusion Science, Institute of Science Education, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756
(Received February 16, 2009/Revised March 10, 2009/Accepted April 14, 2009)

ABSTRACT - In this study, we have developed a fluorescence chromatographic assay for the quantification of total cholesterol in serum, which is a well-known risk predictor for cardiovascular diseases. The new assay system consists of a chromatographic strip in a cartridge, enzyme buffer containing cholesterol esterase, cholesterol oxidase, horseradish peroxidase, and color developer AEC, and a laser fluorescence scanner. The correlation coefficient (r) between cholesterol concentration and relative fluorescence units was 0.968 in the new assay, showing a reliable linearity through the tested range of cholesterol. Recovery test and comparability with a Hitachi 747 instrument showed 106.5-94% and r = 0.939 ($p<0.001$), respectively. The new assay system for cholesterol was developed as a pre-POCT platform conducted in clinics since it is fast (8 min) and uses a small volume of sample (5 μl), and it may be applied for on-site diagnostics to replace expensive automated biochemical analyzer.

Key Words: Total cholesterol, Fluorescence, Chromatographic assay, Laser fluorescence scanner

콜레스테롤은 자주 빛 지방형태의 1가 알코올로서 지방, 담즙, 혈액, 뇌조직, 유즙, 난황, 신경섬유의 수초, 간, 신장, 부신 등에 존재한다. 신체내의 대부분의 콜레스테롤은 간에서 합성되며 일부는 음식물에서 흡수된다. 간에서 합성된 콜레스테롤은 지단백질(lipoprotein), 단백질, 지방산, 트리아실글리세롤과 함께 복합체를 형성하여 체내의 필요한 곳으로 혈액을 통해 운반되는데, 지단백질의 함량이 많은 경우 LDL 콜레스테롤(low density lipoprotein cholesterol), 적을 경우 HDL 콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol)이라고 부른다[1]. 정상인 경우 평균 약 200 mg/dl이나 과콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)은 240 mg/dl 이상의 수치를 나타낸다[2,3]. 포화지방산, 콜레스테롤이 높은 음식을 대량으로 섭취할 경우 혈중의 LDL 콜레스테롤 농도가 증가함으로 혈관 벽에 콜레스테롤이 침착되어 최종적으로 동맥경화를 유발한다[3]. 동맥경화는 백혈구 성분이나 섬유조직의 증식 혹은 근육세포의 증식에 의하여 세포들에 콜레스테롤 성분이 축적되어 일어난다. 동맥의 상피세포조직 하부에 단핵구들이 모여들어 대식세포로 분화하는 과정 중에 혈중의 LDL로부터 콜레스테롤을 받아 축적함으로써 혈관 상피세포층의 뒤틀림이 나타나고 그 결과 혈관 벽에 혈소판의 응집이 일어날 뿐만 아니라 혈소판 유래의 성장인자를 방출하게 되어 이 인자들에 의해 혈관 상피세포의 증식이 자극되어 혈관 지름은 자꾸 줄어들게 된다. 이런 과정이 지속되어 동맥의 혈관을 막아버리는 동맥경화반(artheroscerotic plaque)이 형성되어 혈액의 흐름을 방해한다. 특히 심장의 관상동맥에 동맥경화가 일어날 경우, 심근경색과 같은 치명적인 위험을 동반하기도 한다. 동맥경화는 혈액의 흐름을 방해하므로 혈압이 높게 나타나며 혈중 LDL 콜레스테롤 수치가 높을수록 고혈압일 확률이 높다. 그러므로 콜레스테롤은 고감도 C-반응성 단백질(hs-CRP), 호모시스테인(homocysteine) 등과 함께 뇌/심혈관 질환의 주요 예측인자로 활용되고 있다[3].

콜레스테롤은 그 중 2/3가 에스테르(ester)형으로 존재하고 1/3이 프리(free)형으로 존재하며 콜레스테롤의 측정은 에스테르형와 프리형를 함께 포함한다[4]. 기존의 콜레스테

*Correspondence to: Sang Wook Oh, Department of Biology Education, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756
Tel: 63-270-2785, Fax: 63-270-2781
E-mail:sangwoh@chonbuk.ac.kr

롤 측정방법은 1) Libernabb-Burchard 반응을 이용한 방법, 2) 철-염-산(iron-salt-acid), 3) 톨루엔-술포산(p-toluene-sulfonic acid), 4) enzymatic end point 등이 있다[4]. 콜레스테롤은 아세트산과 황산이 존재하는 조건 하에서 점차적으로 탈수되고, 산화되어 최종적으로 술폰화하여 녹색의 화합물을 생성한다. 이러한 반응을 이용하여 총 콜레스테롤을 측정할 수 있다. 그러나 이 방법은 혈청 측정에 한정되어 있으며, 초원심분리를 이용하여 다른 리포단백으로부터 LDL과 HDL을 분리하여 실험을 행하여만 하기에 조작이 번거롭다. 현재, 임상검사에 주로 이용되고 있는 HDL를 측정하는 방법은 침전법이다. 검체에 침전제를 가하여 HDL 이외의 리포단백질을 응집시키고, 이를 원심분리하여 제거한 다음 HDL만 함유하는 상층액에서 콜레스테롤을 측정하는 방법이다[5]. 이 방법은 초원심분리법이나 전기영동법에 비하여 간단하지만 침전물을 분리하는 조작을 포함하기에 비교적 많은 양의 시료를 필요로 하며 오차가 크고 전체 공정을 자동화하기에 어렵다. 그 외 효소를 이용한 생화학적 반응을 이용한 방법이 있는데 콜레스테릴 에스터라아제(cholesteryl esterase, CE)에 의하여 콜레스테릴 에스테르(cholesteryl ester)가 가수 분해되어 프리형의 콜레스테롤이 되고 프리형은 콜레스테롤 옥사이드(cholesterol oxides, CO)에 의하여 산화되어 과산화수소(H_2O_2)를 생성한다[6]. 과산화수소는 호스래디쉬 페록시다아제(horseradish peroxidase, HRP)에 의하여 발색제와 반응하여 색깔의 변화를 나타나게 된다. 그 과정을 반응식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\text{Cholesteryl ester} + H_2O \xrightarrow{\text{CE}} \text{Cholesterol} + \text{Fatty acid}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{CO}} \text{Cholesten-4-one} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Chromogen(무색)} \xrightarrow{\text{HRP}} \text{Oxidized chromogen(색깔)} + 2H_2O$$

여기에 사용되는 크로모겐(chromogen)의 종류에 따라서 측정 시 필요한 파장과 감도가 결정되는데 발색제로 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine을 이용하여 405/415 nm 에 흡광도를 측정하는 방법, 페놀(phenol)과 4-aminoantipyrine을 반응시켜 515 nm에서 흡광도를 측정하는 방법, MBTH(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone)과 dimethylaniline을 반응시켜 600 nm에서 흡광도를 측정하는 방법, ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinesulphonic acid])와 반응시켜 420/436 nm에서 흡광도를 측정하는 방법, 화학 발광을 이용하는 방법 등이 알려져 있다. 또 효소반응을 이용하여 HDL 중의 콜레스테롤을 분별 정량하는 방법도 검토되고 있다. 이를테면 담즙산염 및 비이온계 계면활성제가 존재하는 조건 하에서 효소반응을 행하는 방법이 알려져 있다. 이 방법은 반응초기의 효소반응은 LDL 중의 콜레스테롤 농도에 비례하고, 다음의 반응 속도는 HDL 중의 콜레스테롤 농도에 비례하는 것을 이용하는 것인데 반응 시간을 분별하여 제어하기란 쉽지 않다. 그 항체를 이용하여 분별 정량하는 방법과 전기화학적인 방법도 시도되고 있다[7,8]. 형광을 이용한 콜레스테롤 방법은 감도도 좋고 간단한 방법으로 80 ng/ml 까지 검출이 가능하다[9].

재료 및 방법

재료

콜레스테롤 표준용액, 효소 CO와 CE, 발색제 AEC는 Sigma(St louis, MO, USA)로부터 구입하였고, HRP는 Kem-En-Tec(Copenhagen, Danmark)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 분석 시약급 이상을 사용하였다. 스트립 제조에 사용된 니트로셀룰로오즈 막(NC, HF180)은 Millipore Corp.(Watertown, MA, USA)에서 구입하였고, 흡수 패드는 Schleicher & Schuell Corp.(Keene, NH, USA)에서 구입하였으며, 시료 패드는 폴사(Pall, New York, USA)에서 구입한 Cytosep 1662를 사용하였다.

혼합용액의 제조

발색제인 AEC는 20 mg을 5 ml의 DMF에 녹여 용액으로 만들어 4°C냉장고에 보관하고 사용하기 직전 2차 증류수로 10배 희석하여 사용하였다. CE, CO 그리고 HRP 효소는 1.5, 3, 8 mg을 0.5 ml의 2차 증류수에 녹여 -20°C에 냉동 보관하였다가 사용하기 전에 각각 1/5로 희석하여 사용하였다.

크로마토그라피 스트립과 카트리지의 제작

0.4 mg/ml의 AEC 용액, 5 unit/ml CE 수용액, 5 unit/ml CO 수용액, 5 unit/ml HRP 수용액의 혼합 용액을 분주기(Biodot)를 이용하여 접착제 카드가 부착되어 있는 니트로셀룰로오즈 막 위의 정해진 위치에 선으로 분주하였다. 건조시킨 막 위에 1% BSA, 0.1% Tween 20이 처리된 시료 패드와 흡수 패드를 차례대로 부착한 다음 60×4.1 mm 크기로 잘라 플라스틱 카트리지의 상판에 접착제 카드가 윈도우 쪽으로 향하도록 뒤집어서 삽입하였다. 시료 투입창이 있는 플라스틱 하판을 상판에 맞추어 카트리지를 조립하고 완성된 카트리지는 크로마토그라피 스트립이 습기를 먹는 것을 방지하기 위하여 제습제와 함께 알루미늄 파우치(pouch)에 넣어 보관하였다. 스트립과 카트리지의 형상은 Fig. 1에서 나타내었다.

크로마토그라피 스트립을 이용한 콜레스테롤 측정

알루미늄 파우치에서 카트리지를 꺼내어 평평하고 깨끗

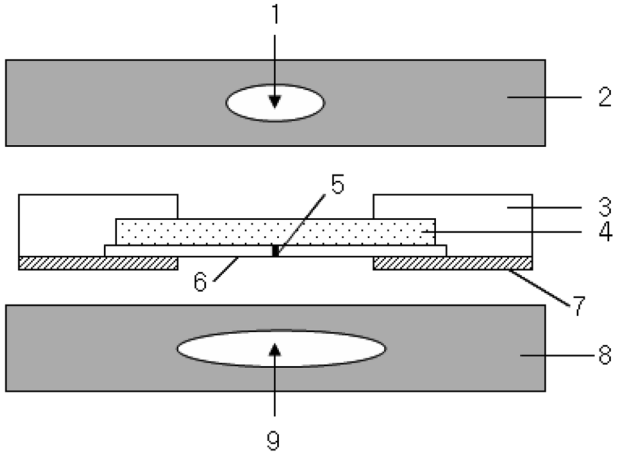

Fig. 1. A schematic diagram of fluorescence cholesterol test strip. 1, sample application zone; 2, plastic housing upper panel; 3, absorption pad; 4, sample pad; 5, enzymes line on nitrocellulose membrane; 6, nitrocellulose membrane; 7, adhesive plastic backing card; 8, plastic housing lower panel; 9, fluorescence scanning window.

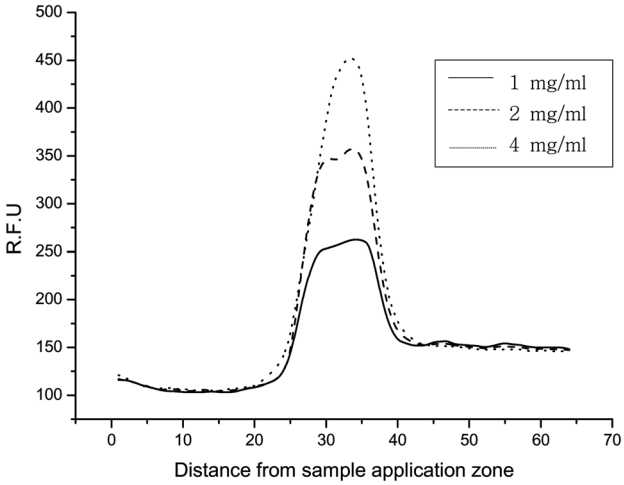

Fig. 2. A scanning profile of the relative fluorescence unit with the laser fluorescence scanner. solid line, 1 mg/ml; dash line, 2 mg/ml; dotted line, 4 mg/ml cholesterol.

한 곳에 놓고 검체 시료 5 μl과 1% NP-40을 포함하는 0.1 M 시트르산 완충용액(pH 5.0) 40 μl을 혼합하여 시료 투입창을 통하여 적하하였다. 반응이 8분간 진행된 후 카트리지를 형광 판독기(BoditechMed Inc., Chuncheon)에 삽입하여 형광 창으로부터 형광세기를 주사(scanning)하여 결과를 얻었다. 얻어진 결과는 가우시안 피팅(Gaussian Fitting) 방법에 의하여 최고점(peak)의 면적값으로 표시 되어졌다.

결과 및 고찰

형광세기의 콜레스테롤 농도 의존성

콜레스테롤의 농도에 따른 형광세기의 변화를 관찰하기 위하여 1, 2, 4 mg/ml 콜레스테롤 표준용액을 카트리지에 각각 적하하고 농도변화에 따른 상대적인 형광 세기를 측정하여 보았다. Fig. 2에서 보여 주듯이, 콜레스테롤 농도가 증가함에 따라 형광의 상대적인 세기도 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 형광의 세기가 콜레스테롤의 농도의 의존하는 것을 보여주는 것으로 제작된 측정 시스템이 적절하게 작동하고 있다는 것을 제시하여 준다. W. T. Law[12]등이 연구한 넓은 띠의 길이에 따른 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법과는 달리 본 실험을 통하여 개발한 시스템에서는 좁은 띠 모양의 최고점이 얻어지기에 좁은 영역에서 형광 판독기의 주사가 한층 용이 하였으며, 간단한 프로그램을 이용하여 최고점의 면적을 쉽게 계산할 수 있었다.

반응 시간에 따른 형광 세기의 변화

콜레스테롤 중 2/3가 에스테르형으로 존재하고 1/3이 프리형으로 존재하기 때문에 CE 효소에 의한 발색 반응의 완전한 진행은 결과에 대하여 현저한 영향을 미친다[4]. 반응 시간에 따른 형광의 세기변화를 관찰하기 위하여 반응시간을 3-9 분으로 변화시키면서 그에 따른 형광의 세기 변화를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 반응시간을 3-4분으로 하였을 경우에는 용액이 니트로셀룰로오즈 막으로 확산되어 반응이 완전히 진행 되지 않았기에 아주 작은 형광의 변화만 나타내었다. 그러나 6-7분 사이에서 비교적 높은 형광을 나타내기 시작하였고, 반응시간을 8-9분 까지 증가하였을 때에는 현저한 형광의 세기 변화를 관찰할 수 있었다. 여러 번의 실험을 거쳐 형광의 세기값이 가장 안정한 8분을 반응시간으로 결정하였다. 현재 임상 현장에서 사용되고 있으면서 컷오프(cut-off) 값을 기준으로 양성/음성을 판별하는 것이 아닌 콜레스테롤 측정값을 제공하여 주는 키트 중 Molecular

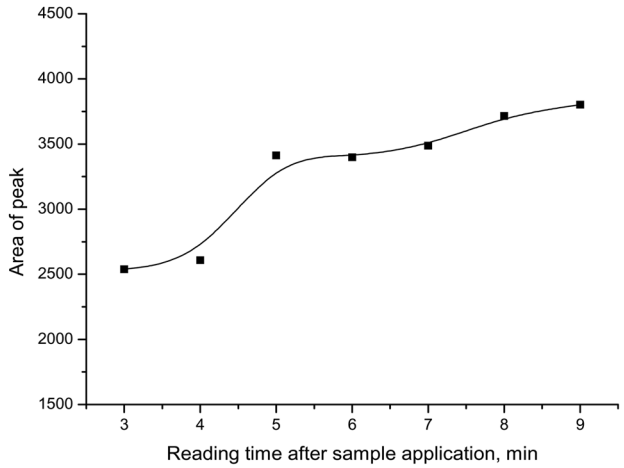

Fig. 3. The relationship of peak area and reading time (min) after sample application.

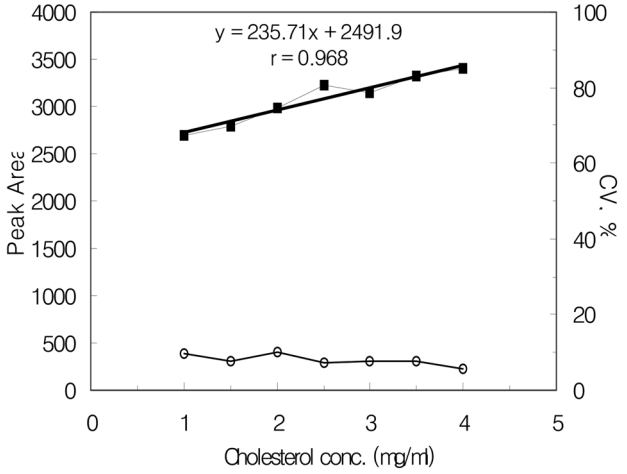

Fig. 4. A calibration curve obtained by plotting the peak area against the concentration of cholesterol and CV (%) at different concentrations of cholesterol.

probes사의 것은 반응 시간이 30분, 콜레스트렉사의 것은 16분인 것에 비하여 본 실험에서 도입된 시스템은 더욱 짧은 시간이 소요되므로 POCT형 콜레스테롤 측정에 적합한 방법이라 사료된다.

경도 곡선

콜레스테롤 농도에 따른 형광 세기의 선형적인 변화를 관찰하기 위하여 콜레스테롤 표준용액 1, 2, 4 mg/ml을 서로 조합하여 여러 가지의 농도로 만든 다음 각 농도에 대하여 5회 측정하여 평균값의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 각각의 콜레스테롤 농도에 의한 형광의 세기는 최고점에서의 면적으로 전환하여 X-축상에 표시하였다. Fig. 4로부터 알 수 있는 바와 같이 1-4 mg/ml 사이에서 콜레스테롤 농도에 따른 최고점에서의 면적은 얻은 경도곡선 $y = 214.22x + 2538.8$의 관계를 만족시키고 이의 상관계수 $r = 0.968$로서 측정 가능 한 콜레스테롤 농도 범위에서 신뢰할 만한 직선성 관계를 제시하여 주었다. 콜레스테롤농도 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mg/ml에서의 변이계수(CV, %)는 각각 9.7, 7.5, 10.0, 7.1, 7.8, 7.6, 5.6% 로 나타났다. 즉 측정 시 해당하는 모든 농도에서 변이계수는 10% 내에 분포하였으므로 이러한 결과는 본 실험에서 개발되어 적용된 형광 크로마토그라피에 의한 방법이 이전에 보고된 다른 콜레스테롤 농도 측정 방법의 결과와 비교시 신뢰할 수 있는 측정방법임을 확인할 수 있는 것이라고 사료된다.

회복률

농도 단위로 측정되는 형광 크로마토그라피 분석의 정확성을 확보하기 위하여 회복률을 조사하여 보았다. 독립적으로 콜레스테롤 농도 1, 2, 3, 4 mg/ml에서 각 농도 당 10회의 분석을 수행하고 그들의 평균 농도값과 회복률(%)을 구하여 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 제시하듯이 측정한 콜레스테롤 모든 농도 1-4 mg/ml 범위에서 회복률은 106.5-94%를 나타내었다. 과콜레스테롤혈증 환자인 경우 콜레스테롤 농도 2.0 mg/ml이상이 관찰되므로 그러한 환자의 시료도 본 실험의 측정방법으로도 상대적으로 정확한 값을 읽을 수 있을 것이라는 사실을 제시해 준다고 할 수 있겠다.

Table 1. Recovery performance of fluorescence cholesterol assay

Measured conc. (mg/ml)[1]	Expected conc. (mg/ml)	Recovery (%)
0.95	1.0	95.0
2.13	2.0	106.5
2.87	3.0	95.6
3.76	4.0	94.0

[1]Mean value was obtained from 10 independent experiments at each different concentration of cholesterol.

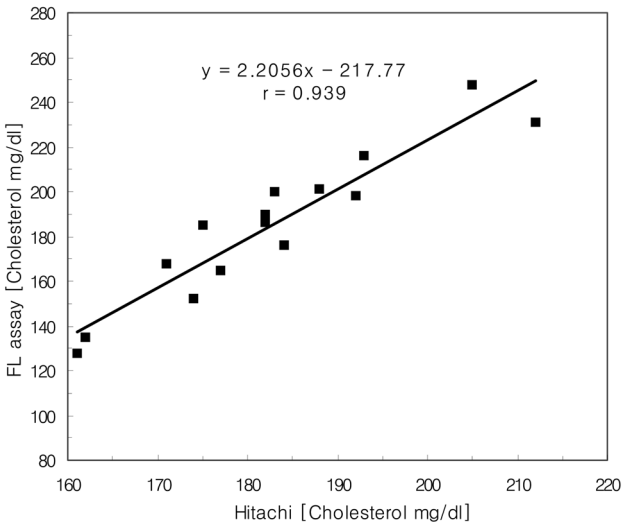

Fig. 5. A comparison of method between the spectroscopy assay on Hitachi 747 analyzer and the fluorescence assay method from serum samples.

혈청시료 적용

본 콜레스테롤 측정방법의 실시료 적용여부를 조사하기 위하여 혈청 15개를 선택하여 본 방법으로 측정한 결과를 Hitachi 747를 이용하여 얻은 결과와 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이 본 방법으로 측정한 결과와 Hitachi 747의 결과는 상관관계 $r = 0.939$ ($p<0.001$)로 비교적 높은 유의성을 보였다. Hitachi 747은 암모니움 설페이트(ammonium sulfate)를 이용하여 침전물에 의한 흡광도의 차이를 측정하는 방법을 사용한 자동생화학 분석기로서 간기능, 신장검사, 고지혈증, 당뇨, 췌장질환, 근육효소, 전해질, 철분대사 검사 등의 검사를 소량의 혈액으로 검사할 수 있으며 현재 많은 대형 병원들에

서 이 기기를 사용되고 있다. Hitachi 747 자동분석기에서 얻은 결과와 개발한 형광 콜레스테롤 측정법에서 얻은 결과를 비교 하였을 때 경도곡선의 기울기가 2.2로써 비교적 큰 차이를 보여 주었는데 이것은 두 측정 방법사이의 검출 방법상의 차이로 생각되므로 이에 대한 보정이 필요하다고 사료된다. 또한 현재의 추세는 대부분의 POCT형 기기들이 부차적인 기구의 사용을 필요로 하지 않는 전혈(whole blood)을 사용하는데 비하여 본 연구에서의 형광 크로마토그라피에 의한 콜레스테롤 측정법은 혈청을 이용하고 있다. 이 단계가 개선될 여지가 충분히 있으며 현재 이에 대한 연구가 진행되고 있는 실정이다.

결 론

본 연구에서는 혈중 콜레스테롤 양의 측정을 위하여 Fig. 1과 같은 구조를 갖는 크로마토그라피 스트립을 제작하고 휴대용이 가능한 형광 판독기를 이용하여 반응에 따른 형광세기의 변화를 측정하는 시스템을 개발하고자 하였다. 콜레스테롤 측정 시스템은 효소가 분주되어져 있는 크로마토그라피 스트립, 버프용액 그리고 형광판독기로 구성되어 있다. CO에 의하여 생성된 H_2O_2의 양에 비례하여 발색제 3-amino-9-ethyl carbazole(AEC)는 반응에 참여하며 반응에서 생성된 유색물질은 다중체(polymer) 형태로 선상에 남아있게 되며 이를 휴대용이 가능한 간편한 형광 판독기를 이용하여 측정이 가능하도록 하였다. 이때의 반응식을 수식으로 나타내면 다음과 같다.

$$HRP + H_2O_2 \xrightarrow{AECH_2} \text{Compound I} \xrightarrow{AECH^*} \text{Compound II} \xrightarrow{AECH_2} HRP + 2H_2O$$

$$AECH^* + AECH^* \longrightarrow ((AEC)_2)_n$$

본 연구에서 개발된 새로운 콜레스테롤 측정법은 농도 변화에 따른 형광 세기 변화로 얻은 상관관계, 회복률 그리고 Hitachi 747 자동화 검사기기와의 비교에서 얻은 상관관계 등에서 비교적 높은 유의성을 보여주었다. 적은 시료량 (5 μl)의 사용, 빠른 반응 시간 (8분), 그리고 스트립의 저비용성 등을 고려할 때 개발된 콜레스테롤 농도 측정법은 전문가 없이 작은 클리닉에서 사용가능한 준현장 검사 플랫폼형식을 지닌 검사시스템이다.

요 약

본 연구에서는 심혈관계 질환의 표지인자인 콜레스테롤의 농도를 새롭게 개발한 형광 크로마토그라피 방법에 의하여 측정 하고자 시도하였다. 개발된 측정 시스템은 크로마토그라피 스트립이 들어 있는 카트리지, 발색제 AEC, 콜레스테롤 옥사데이즈 (Cholesterol Oxidase, CO), 콜레스테롤 에스트라아제(Cholesterol Esterase, CE), 호스래디쉬 페록시다아제(Horseradish peroxidase, HRP)를 포함하는 효소혼합 수용액, 그리고 형광 판독기로 구성되어 있다. 콜레스테롤 농도 변화에 따른 형광 세기 변화로 얻은 상관계수 $r = 0.968$로 측정 가능한 농도 범위에서 신뢰할 만한 직선성 관계를 제시하여 주었다. 회복률과 Hitachi 747 검사기기와 비교 테스트에서는 각각 106.5-94%와 상관관계 $r = 0.939$ ($p<0.001$)로 비교적 높은 유의성을 보여주었다. 따라서 본 연구에서 개발된 새로운 콜레스테롤 농도 측정법은 빠른 반응 시간 (8분)과 적은 시료량 (5 μl)을 사용하기에 시료를 실험실로 운반할 필요없이 클리닉에서 측정 가능한 준현장검사 플랫폼형으로 개발되었으며 기존의 고가의 자동화 장비를 사용하는 생화학적 진단방식 대체용으로의 응용이 기대된다.

참고문헌

1. Nelson, D.L. and Cox M.M.: Lehninger Principles of Biochemistry. 4th Ed., W. H. Freeman, NewYork, pp. 482-484 (2004).
2. Highlights of the report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, National Cholesterol Education Program, NIH publication No. 88-2926 (1987).
3. Bachorik, P.S., and Ross, J.W.: National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clin. Che*m., **41**, 1414-1420 (1995).
4. Kaplan, L.A. and Pesce, A.J.: Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation. 3rd Ed., Mosby Company, St. Louis, Chapter 30 (1996).
5. Cobbaert, C., Mulder, P.G., Baadenhuijsen, H., Zwang, L., Weykamp, C.W. and Demacker, P.N.: Survey of total error of precipitation and homogeneous HDL-cholesterol methods and simultaneous evaluation of lyophilized saccharose-containing candidate reference materials for HDL-cholesterol. *Clin. Chem.,* **45**, 360-370 (1999).
6. Bishop, M.L., Duben-Engelkirk, J.L., and Fody, E.P.: Clinical Chemistry: Principle, Procedures, Correlations. 5th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Chapter 12, Lipid and Lipoprotein (2004).
7. Paek, S.H., Jang, M.R., Mok, R.S., Kim, S.C., and Kim, H.B.: Immunochromatographic membrane strip assay system for a single-class plasma lipoprotein cholesterol, exemplified by high-density lipoprotein cholesterol measurement. *Biotechnol Bioeng*., **62**(2), 145-154 (1999).
8. Kumar, H, Kumar, A., Kumari, P., Jyotirmai, S. and Tulsani, N.B.: Immobilization of cholesterol oxidase on Formvar using organic solvents. *Biotechnol. Appl. Biochem.,* **30,** 231-

233 (1999).
9. Amundson, D.M. and Zhou M.: Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **38**, 43-52 (1999).
10. Kim, BC., Jeong, JH., Jeong, DS,. Choi, EY., Kim, J.H. and Nahm, KB.: Simplified laser fluorescence scanner for proteomics studies and early cancer diagnosis. *SPIE Proceedings*, **4916,** 103-108 (2002).
11. Ahn JS, Choi S, Jang SH, Chang HJ, Kim JH, Nahm, KB, Oh SW, and Choi EY.: Development of a point-of-care assay system for high-sensitivity C-reactive protein in whole blood. *Clin Chim Acta,* **332,** 51-59 (2003).
12. Law, W.T., Doshi, S., McGeehan, J., McGeehan, S., Gibboni, D., Nikolioukine, Y., Keane, R., Zheng, J., Rao, J. and Ertingshausen, G.: Whole-blood test for total cholesterol by a self-metering, self-timing disposable device with built-in quality control. *Clin. Chem*., **43**(2), 384-389 (1997).
13. Rifai, N. and Pidker, P.M.: Proposed cardiovascular risk assessment algorithm using high-sensitivity C-reactive protein and lipid screening. *Clin. Chem.*, **47,** 28-30 (2001).