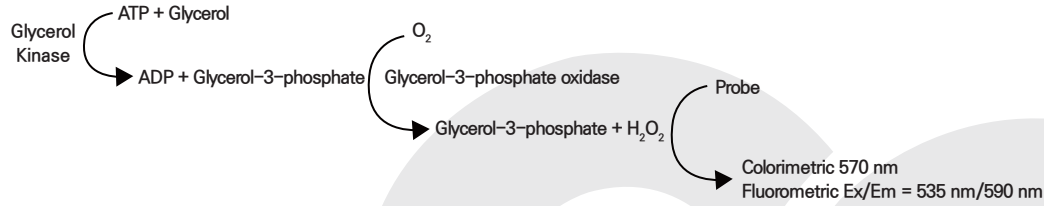


## PicoSens™ Free Glycerol Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)

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

### 실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Free Glycerol Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)에서 Glycerol(Glycerol-6-phosphate)의 인산화과정에서 발생하는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 Probe가 반응하여 흡광도 570 nm, 형광 Excitation/Emission = 535 nm/590 nm에서 측정되며 이를 통해 Sample 내의 Glycerol의 양을 확인할 수 있습니다.

### 실험 원리

Components	Size	Storage
Glycerol Assay Buffer	25 mL	-20°C
Glycerol Enzyme Mix (Lyophilized)	1 vial	
Glycerol Probe	200 $\mu\text{L}$	
Glycerol Standard (100 mM)	100 $\mu\text{L}$	

\* 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
- ▶ 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.
- ▶ **Glycerol Assay Buffer** : 사용 후 -20 °C 또는 4 °C에 보관합니다.
- ▶ **Glycerol Enzyme Mix** : Glycerol Assay Buffer 220  $\mu\text{L}$ 를 넣고 녹입니다. 사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.
- ▶ **Glycerol Probe** : 사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.
- ▶ **Glycerol Standard** : 사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

### Sample type

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

### Sample preparation

#### Serum

Serum sample의 경우, Anti-oxidants을 제거 하기 위해 실험을 진행하기 전에 Carrez Reagent Kit (BM-CAR-100) 사용을 권장합니다.

#### Tissue / Cell

$1 \times 10^6$  Cells이나 10 mg의 Tissues를 Glycerol Assay Buffer 500  $\mu\text{L}$ 에 넣고 Homogenize 합니다. 그 후 10,000 xg에서 10 min 간 Centrifuge한 후, 상층액을 새로운 Tube로 옮깁니다. 추출한 Sample은 필요에 따라 Carrez Reagent Kit (BM-CAR-100)를 이용하여 정제합니다.

※ **Sample 결과에 영향을 줄 수 있는 단백질, 지질 또는 Turbidity**를 제거하기 위한 전처리가 필요할 시 당사로 문의 바랍니다.(Cat# BM-CAR)

## 실험 과정

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

## Colorimetric method

### Standard preparation

100 mM Glycerol Standard 10  $\mu\text{L}$ 와 Glycerol Assay Buffer 990  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 1 mM Standard solution을 만들어 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 1 mM Standard solution ( $\mu\text{L}$ )*	Assay Buffer ( $\mu\text{L}$ )*	Final STD Vol. in well ( $\mu\text{L}/\text{well}$ )	Final STD Amount in well (nmol/well)
Blank	0	50	50	0
2	2	48	50	2
3	4	46	50	4
4	6	44	50	6
5	8	42	50	8
6	10	40	50	10

\* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate 이상을 권장합니다.

- 준비된 Sample 2~50  $\mu\text{L}$ 를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 Glycerol Assay Buffer로 50  $\mu\text{L}$ 가 되도록 조정합니다.

- Serum sample일 경우 10  $\mu\text{L}$  분주 후 Glycerol Assay Buffer로 50  $\mu\text{L}$ 가 되도록 조정합니다.

- 준비된 Standard solution을 각 Well에 50  $\mu\text{L}$ 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	46 $\mu\text{L}$	48 $\mu\text{L}$
Enzyme Mix	2 $\mu\text{L}$	- $\mu\text{L}$
Probe	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

\* 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  $\mu\text{L}$  씩 분주합니다.

\* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50  $\mu\text{L}$ 를 분주합니다.

- 빛을 차단하여 상온에서 30 min 동안 Incubation 후 Microplate reader로 흡광도 570 nm에서 측정합니다.

## Fluorometric method

### Standard preparation

100 mM Glycerol Standard 10  $\mu\text{L}$ 와 Glycerol Assay Buffer 990  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 1 mM Standard solution을 만듭니다. 1 mM Standard solution 10  $\mu\text{L}$ 와 Glycerol Assay Buffer 90  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 100  $\mu\text{M}$  Standard solution을 만들어 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 100 $\mu\text{M}$ Standard solution ( $\mu\text{L}$ )*	Assay Buffer ( $\mu\text{L}$ )*	Final STD Vol. in well ( $\mu\text{L}/\text{well}$ )	Final STD Amount in well (nmol/well)
Blank	0	50	50	0
2	2	48	50	0.2
3	4	46	50	0.4
4	6	44	50	0.6
5	8	42	50	0.8
6	10	40	50	1.0

\* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate 이상을 권장합니다.

- 준비된 Sample 2~50  $\mu\text{L}$ 를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 Glycerol Assay Buffer로 50  $\mu\text{L}$  가 되도록 조정합니다.

- 준비된 Standard solution을 각 Well에 50  $\mu\text{L}$  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	47.5 $\mu\text{L}$	49.5 $\mu\text{L}$
Enzyme Mix	2 $\mu\text{L}$	- $\mu\text{L}$
Probe	0.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$

\* 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  $\mu\text{L}$  씩 분주합니다.

\* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50  $\mu\text{L}$ 를 분주합니다.

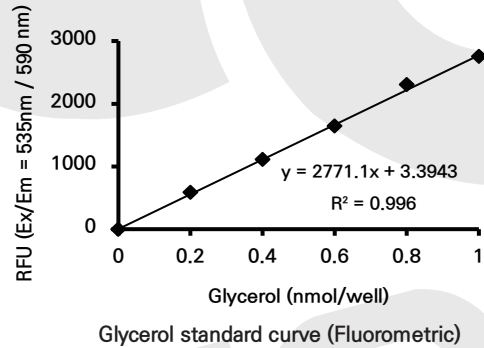
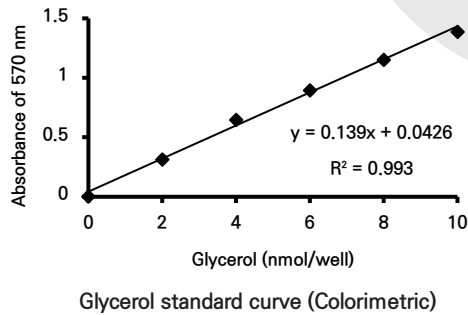
- 빛을 차단하여 상온에서 30 min 동안 Incubation 후 Fluorometric microplate reader로 Excitation/Emission = 535 nm/590 nm 에서 측정합니다.

## 결과 분석

- Glycerol molecular weight: 92.09 g/mol
- 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 Glycerol의 양으로 다음 식을 이용하여 Sample 내 Glycerol 의 농도를 구합니다.

$$C \text{ (nmol/}\mu\text{l or }\mu\text{mol/ml or mM)} = B/V \times D$$

- C : Sample의 Glycerol 농도 (nmol/ $\mu$ l)
- B : 측정 Well의 Glycerol 양 (nmol)
- V : Well에 분주한 Sample의 Volume ( $\mu$ l)
- D : Sample 희석 배율



### 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-CHO-100	PicoSens™ Total Cholesterol Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)
BO-TBR-200	OxiTec™ TBARS Assay kit (Colorimetric)

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.