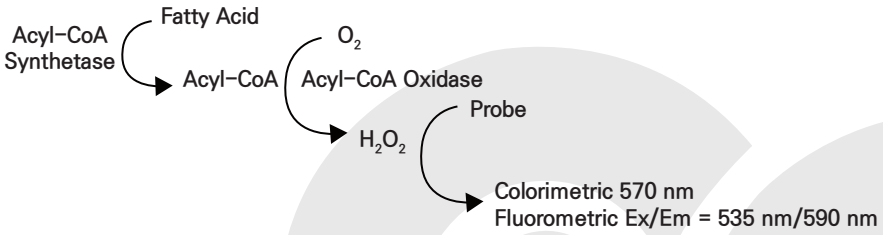
FOR RESEARCH USE ONLY!

PicoSens™ Free Fatty Acid Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)

(BM-FFA-100, 100 assays, Store at -20℃)

실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Free Fatty Acid Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)에서 Fatty acid가 Acyl-CoA Synthetase에 의해 Acyl-CoA 유도체로 전환되며 Acyl-CoA Oxidase에 의해 산화되는데 이 과정에서 발생하는 H_2O_2 가 Probe와 반응하여 흡광도 570 nm, 형광 Excitation/Emission = 535 nm/590 nm에서 측정되며 이를 통해 Fatty Acid 농도를 확인할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Fatty Acid Assay Buffer	25 ㎖	
Fatty Acid Enzyme Mix (Lyophilized)	1 vial	
ACS Reagent (Lyophilized)	1 vial	-20℃
Enhancer	200 ㎕	
Fatty Acid Probe	200 ㎕	
Fatty Acid Standard (1 mM)	300 ㎕	

*** 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20 ℃ 보관 시 1년 간 안정적입니다.**

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Water bath or Heat block (37℃, 50℃, 90℃)
- ▶ 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.
- ▶ **Fatty Acid Assay Buffer** : 사용 후 4 ℃ 또는 -20 ℃에 보관합니다.
- ▶ **Fatty Acid Enzyme Mix** : Fatty Acid Assay Buffer 220 ㎕를 넣고 녹입니다. Solution 상태의 Enzyme Mix는 빠른 시간 내에 사용하시는 것을 권장합니다.
- ▶ **ACS Reagent** : Fatty Acid Assay Buffer 220 ㎕를 넣고 녹입니다. 사용 후 -20 ℃에 보관할 수 있으며 1 개월 이내에 사용합니다.
- ▶ **Enhancer** : 사용 후 -20 ℃에 보관할 수 있으며 2 개월 이내에 사용합니다.
- ▶ **Fatty Acid Probe** : 사용 후 -20 ℃에 보관할 수 있으며 1 개월 이내에 사용합니다.

Sample type

- ・Tissues : Liver etc.
- ・Blood, Serum, Plasma and Other body fluids
- ・Cells, Growth media
- ・Food etc.

Sample preparation

Liquid

Liquid sample의 경우 바로 희석하여 실험에 사용할 수 있습니다. 만약 농도를 모르는 Sample의 경우 Standard curve range (1~10 nmol/well Colorimetric, 0.1~1 nmol/well Fluorometric)에 오도록 Sample을 다양한 희석배율로 테스트합니다.

Blood

Blood의 경우, Anticoagulant 용액을 사용합니다. EDTA, Sodium citrate등 여러가지가 사용이 가능하지만 Heparin이 들어간 용액은 Interference 작용으로 인해 사용을 권하지 않습니다.

Tissue / Cell

Cells과 Tissue samples: 1 X 10^6 Cells또는 10 mg의 Tissues를 200 ㎕의 용개 (1% Triton X-100 in pure-chloroform) 용액에 넣고 Homogenize 합니다. 그 후 5~10 min간 Centrifuge하여 유기 용매를 Microtube로 옮기고 50℃에서 30 min Air dry 를 하여 Chloroform을 제거합니다. 그 후 Fatty Acid Assay Buffer 200 ㎕에 녹인 후 5 min 간 Vortexing 합니다.

Standard preparation

-20 ℃ 보관 시 Aqueous phase가 분리될 수 있으므로 사용 전 상온에서 충분히 녹인 후, 80 ~ 90 ℃ Water bath 또는 Heat block에서 1 min 간 또는 용액이 뿌옇게 될 때까지 Incubation 합니다. (Vial cap이 잘 닫혀있는지 반드시 확인합니다.) 30 sec 동안 Vortexing 후 Cool down하면 용액이 투명해지는 것을 확인합니다. Heating & Vortexing 을 두 번 더 반복 후 상온에서 충분히 Cool down 후에 사용합니다.

Copyright©2023 BIOMAX Co, Ltd. All right reserved
info@scgbiomax.com

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 Sample을 Background control로 준비합니다.
* Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.

Colorimetric method

Standard preparation

1 mM Fatty Acid Standard를 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 1 mM Fatty Acid Standard (㎕)*	Assay Buffer (㎕)*	Final STD Vol. in well (㎕/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

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

① 준비된 Sample 2~50 ㎕를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 Fatty Acid Assay Buffer로 50 ㎕가 되도록 조정합니다.
② 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 ㎕씩 분주합니다.
③ 각 well당 ACS Reagent을 2 ㎕씩 넣고 37 ℃에서 30 min 동안 Incubation 합니다.
④ Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.
* 높은 Background을 갖는 Sample의 경우 Background control mix를 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Mix	
	Reaction (50 ㎕/well)	Background Control (50 ㎕/well)
Assay Buffer	44 ㎕	46 ㎕
Enzyme Mix	2 ㎕	- ㎕
Enhancer	2 ㎕	2 ㎕
Probe	2 ㎕	2 ㎕

* 50 ㎕/well 기준으로 Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)
⑤ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 혼합한 Reaction mix를 50 ㎕ 씩 분주합니다.
* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50 ㎕를 분주합니다.
⑥ 빛을 차단하여 37℃에서 30 min 동안 Incubation 후 Microplate reader로 흡광도 570 nm에서 측정합니다.

Fluorometric method

Standard preparation

1 mM standard 10 ㎕와 Fatty Acid Assay Buffer 90 ㎕를 혼합하여 100 μM Standard solution을 만들어 아래표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 100 μM Fatty Acid Standard (㎕)*	Assay Buffer (㎕)*	Final STD Vol. in well (㎕/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.*

① 준비된 Sample 2~50 ㎕를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 Fatty Acid Assay Buffer로 50 ㎕가 되도록 조정합니다.
② 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 ㎕ 씩 분주합니다.
③ 각 well당 ACS Reagent을 2 ㎕씩 넣고 37 ℃에서 30 min 동안 Incubation 합니다.
④ Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.
* 높은 Background을 갖는 Sample의 경우 Background control mix를 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Mix	
	Reaction (50 ㎕/well)	Background Control (50 ㎕/well)
Assay Buffer	45.6 ㎕	47.6 ㎕
Enzyme Mix	2 ㎕	- ㎕
Enhancer	2 ㎕	2 ㎕
Probe	0.4 ㎕	0.4 ㎕

* 50 ㎕/well 기준으로 Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)
⑤ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 혼합한 Reaction mix를 50 ㎕ 씩 분주합니다.
* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50 ㎕를 분주합니다.
⑥ 빛을 차단하여 37℃에서 30 min 동안 Incubation 후 Fluorometric microplate reader로 Excitation/Emission = 535 nm/590 nm 에서 측정합니다.

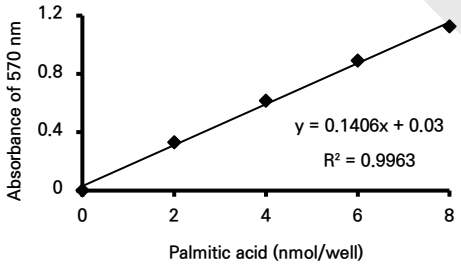
Copyright©2023 BIOMAX Co, Ltd. All right reserved
info@scgbiomax.com

결과 분석

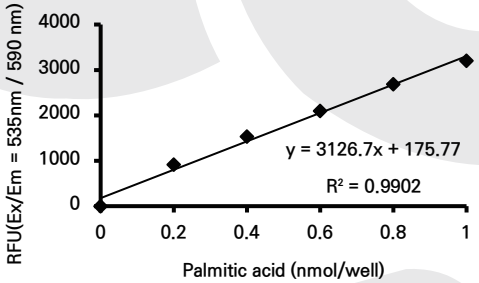
- **Palmitic acid molecular weight: 256.42 g/mol**
- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.
- 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.
  * Sample background control을 설정한 경우 Sample의 측정값에서 Sample background control 측정값과 Blank 측정 값을 모두 뺍니다.
- Standard curve에 Sample의 OD 값을 대입하여 구한 Palmitic acid 의 양으로 다음 식을 이용하여 Sample 내 Palmitic acid 의 농도를 구합니다.

C (nmol/㎕ or umol/㎖ or mM) = B/V x D

C : Sample의 Palmitic acid 농도 (nmol/㎕)
B : 측정 Well의 Palmitic acid 양 (nmol)
V : Well에 분주한 Sample의 Volume (㎕)
D : Sample 희석 배율



Palmitic acid standard curve (Colorimetric)



Palmitic acid standard curve (Fluorometric)

Related products

BM-CDL-100	PicoSens™ HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
BM-CHO-100	PicoSens™ Total Cholesterol 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 *MSDS*를 참조하십시오.**

Copyright©2023 BIOMAX Co, Ltd. All right reserved
info@scgbiomax.com