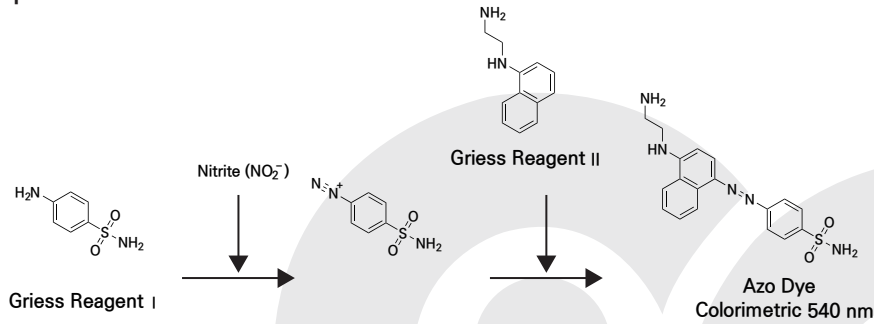


# PicoSens™ Griess Reagent Assay Kit (Colorimetric)

(BM-GRI-1000, 1000 assays, Store at 4°C)

## 실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Griess Reagent Assay Kit (Colorimetric)에서 Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)와 Griess Reagent I 의 반응으로 형성된 중간산물이 Griess Reagent II와 반응하여 Azo dye를 생성합니다. 이는 흡광도 540 nm 에서 측정되며 이를 통해 Sample 내의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 양을 확인할 수 있습니다.

## 제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Nitrite Standard (2 mM)	1 mL x 2 vials	4 °C
Griess Reagent I	50 mL	
Griess Reagent II	50 mL	

\* 개봉하지 않은 제품은 4 °C에서 보관 시 6 개월 까지 안정적입니다.

## 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Phosphate Buffered Saline (PBS)
- ▶ D.W.
- ▶ Microplate reader (540 nm Filter)
- ▶ Ice bucket
- ▶ 8 or 12 Channel microplate
- ▶ Reservoir
- ▶ Microtube
- ▶ Shaker
- ▶ Aluminum foil
- ▶ 10,000 MWCO Filter

## 실험 전 준비사항 및 보관 방법

- ▶ 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- ▶ Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.
- ▶ 모든 제품은 실험 시 얼음에 꽂아서 사용합니다.
- ▶ Griess Reagent를 반드시 차광 및 4°C 보관합니다.
- ▶ Griess Reagent I, II를 혼합하여 보관이 불가합니다.

## Sample type

- Serum, Plasma, Urine, Saliva
- Tissues
- Cell culture : Adherent or Suspension cells, Supernatant

## Sample pre-treatment

- Sample에 단백질이 포함 되어있는 경우 10,000 MWCO로 필터 합니다.
- 반드시 Sample을 희석하여 사용합니다. (1 : 2 이상)
- NADPH (0.5 ~ 1 mM)에 의해서 Griess Reaction이 저해될 수 있습니다. NADPH가 들어간 Sample 사용시 충분히 희석시켜 NADPH의 영향을 최소한으로 줄입니다.

**Serum** : PBS로 희석 후 필터하여 바로 사용합니다.

**Plasma** : PBS로 희석 후 필터하여 바로 사용합니다. Citrate plasma를 사용할 것을 권장합니다. EDTA나 Heparin이 처리된 Plasma가 사용될 경우, Griess reaction 중 단백질이 침전하여 결과 값이 달라질 수 있습니다.

**Saliva** : PBS로 희석 후 필터하여 바로 사용합니다. Saliva에서 유래한 Sample의 경우 구강균에 의해 Nitrite, Nitrate의 값이 매우 높게 나올 수 있으니 1 : 2 ~ 1 : 100까지 희석하여 사용합니다.

**Urine** : Fresh urine sample을 PBS로 희석 (적어도 1 : 20 이상) 후 필터하여 바로 사용합니다. 보관 시 항생제 (Penicillin 또는 Streptomycin 100 U/mL) 또는 2-propanol에 6.5% 희석하여 -80°C에서 보관합니다.

**Cell** : 2 X 10<sup>6</sup> cells을 PBS로 Wash한 후, PBS에 균질화 시켜 4°C에서 최대속도로 5 min 간 Centrifuge 합니다. 상층액을 회수하여 PBS에 희석한 후 필터하여 사용합니다.

**Culture supernatant** : RPMI 1640등의 Nitrite, Nitrate 함량이 높은 배지는 권고하지 않습니다. Standard 제작 시 PBS대신 Culture에 사용한 배지와 동일한 배지를 혼합하여 만듭니다.

## Standard preparation

**Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) standard** : 2 mM Nitrite Standard 50 μℓ와 PBS 450 μℓ를 혼합하여 200 μM Standard solution 을 만듭니다. 이를 1/2씩 Serial dilution하여 8 구간의 Standard solution을 아래 표와 같이 만들어 사용합니다.

STD No.	STD Stock	Vol. of STD Stock (μℓ)	PBS (μℓ)	STD Concentration (μM)	Final STD Amount in well (nmol/well)
7	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Standard (2 mM)	50	450	200	10
6	STD No. 7	250	250	100	5
5	STD No. 6	250	250	50	2.5
4	STD No. 5	250	250	25	1.25
3	STD No. 4	250	250	12.5	0.625
2	STD No. 3	250	250	6.25	0.3125
1	STD No. 2	250	250	3.125	0.15625
Blank	0	0	250	0	0

\* 매 실험마다 Standard를 새로 그립니다.

## 실험 과정

- \* 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행 후 사용을 권장합니다.
- \* Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.
- \* Griess Reaction 후 공기중의 NO에 의해 반응이 일어날 수 있으니 1 h 내로 흡광도를 측정합니다.
- \* Griess Reagent의 순서에 유의합니다.
- \* Duplicate 또는 Triplicate를 권장합니다.

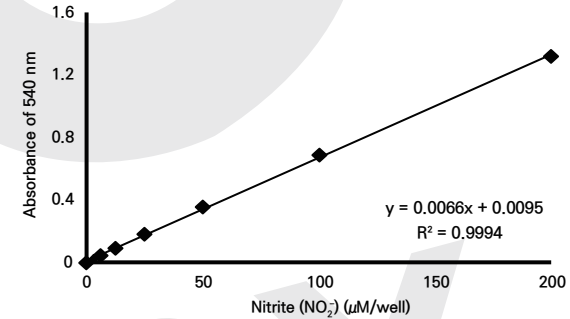
- ① 준비된 Sample 2~50 μℓ를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 PBS 로 50 μℓ가 되도록 조정합니다.
- ② 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 μℓ씩 분주합니다.
- ③ PBS를 Sample well과 Standard well에 50 μℓ 씩 분주합니다.
- ④ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 Griess Reagent I 을 50 μℓ씩 첨가합니다.
- ⑤ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 Griess Reagent II를 50 μℓ씩 첨가합니다.
- ⑥ 빛을 차단하여 상온에서 10 min 반응시키고 Microplate reader로 흡광도 540 nm에서 측정합니다.

## 결과 분석

- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.
- 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.
- Sample의 흡광도 값이 2.5를 넘어가면 Sample을 희석하여 사용합니다.
- Standard curve에 Sample의 OD 값을 대입하여 구한 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 양으로 다음 식을 이용하여 Sample 내 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도를 구합니다.

$$C (\mu\text{M}) = B \times D$$

C : Sample의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 농도 (μM)  
 B : 측정 Well의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 농도 (μM)  
 D : Sample 희석 배율



## Related products

BM-NIT-200

PicoSens™ Total Nitric Oxide Assay Kit (colorimetric)

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.