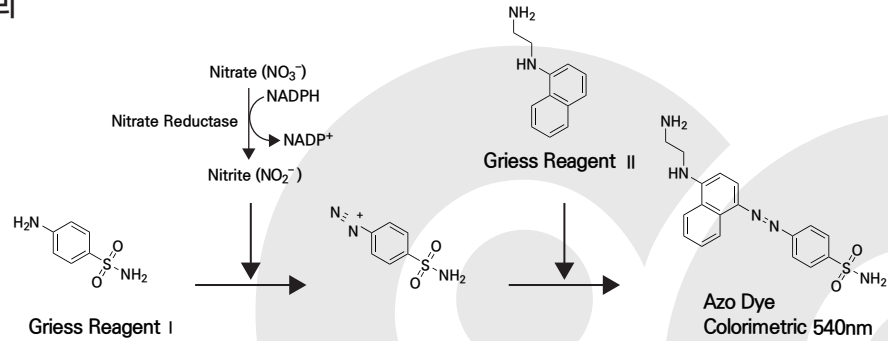


## PicoSens™ Total Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)

(BM-NIT-200, 200 assays, Store at -20°C)

### 실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Total Nitric Oxide (NO) Assay Kit (Colorimetric)에서 Nitrate( $\text{NO}_3^-$ )는 Nitrate reductase에 의해 Nitrite( $\text{NO}_2^-$ )로 변환됩니다. 변환된  $\text{NO}_2^-$ 와 Griess Reagent I의 반응으로 형성된 중간산물이 Griess Reagent II와 반응하여 Azo dye를 생성합니다. 이는 흡광도 540 nm에서 측정되며 이를 통해 Sample 내의 Total Nitric Oxide( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )의 양을 확인할 수 있습니다.

### 제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
10X Assay Buffer	10 ml	-20°C
Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) Standard (2 mM)	0.5 ml	
Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) Standard (1 mM)	0.5 ml	
Griess Reagent I	10 ml	
Griess Reagent II	10 ml	
Nitrate Reductase (Lyophilized)	2 vials	
10X Cofactor (Lyophilized)	2 vials	
Enhancer	1 ml x 2 vials	

\* 개봉하지 않은 제품은 -20°C에서 보관 시 6개월까지 안정적입니다.

### 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ D.W.
- ▶ Microplate reader (540 nm Filter)
- ▶ Ice bucket
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Reservoir
- ▶ Microtube
- ▶ Shaker
- ▶ Aluminum foil

### 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.
- ▶ **10X Assay Buffer** : 사용 전 D.W.에 10배 희석하여 1X Assay buffer를 만들어 사용합니다. 희석 후 4°C에 보관하여 사용합니다.
- ▶ **Nitrate Reductase** : 실험 직전, D.W. 1 ml 첨가하여 완전히 녹인 후 실험에 사용량만큼 Aliquot 하여 -20°C에 보관합니다. 사용할 Nitrate Reductase는 D.W.로 1 : 1.5 희석하여 1X Nitrate Reductase 만들어 사용합니다. ex) Nitrate Reductase : D.W. = 100  $\mu\text{l}$  : 150  $\mu\text{l}$  (10 Wells 분량)  
\* 1X Nitrate Reductase는 4°C에 보관할 경우 1주일까지 사용 가능합니다. 냉동과 해동과정을 많이 반복할 경우 활성이 떨어질 수 있습니다.
- ▶ **10X Cofactor** : 실험 직전, D.W. 0.5 ml 을 첨가하여 완전히 녹인 후 1회 사용량만큼 Aliquot 하여 -20°C에 보관합니다. 사용할 10X Cofactor를 D.W.에 10배 희석하여 1X Cofactor를 만든 후 사용합니다.

### Sample type

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

### Sample preparation

- Sample에 단백질이 포함 되어있는 경우 10,000 MWCO로 필터합니다.
- 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** : 1X Assay buffer로 희석 후 필터하여 바로 사용합니다.
- Plasma** : 1X Assay buffer로 희석 후 필터하여 바로 사용합니다. Citrate plasma를 사용할 것을 권장합니다. EDTA 나 Heparin이 처리된 Plasma가 사용될 경우, Griess reaction 중 단백질이 침전하여 결과 값이 달라질 수 있습니다.
- Saliva** : 1X Assay Buffer로 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 1X Assay buffer로 희석 (최소 1 : 20 이상) 후 필터하여 바로 사용합니다.
- Cell** : 2 X 10<sup>6</sup> cells를 1X Assay buffer로 Wash한 후, 1X Assay buffer에 균질화 시켜 4°C에서 최대속도로 5 min 간 Centrifuge 합니다. 상층액을 회수하여 1X Assay buffer에 희석한 후 필터하여 사용합니다.
- Culture supernatant** : RPMI 1640등의 Nitrite, Nitrate 함량이 높은 배지는 권고하지 않습니다. Standard 제작 시 1X Assay buffer대신 Culture에 사용한 배지와 동일한 배지를 혼합하여 만듭니다.

## Standard preparation

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

STD No.	STD Stock	Vol. of STD Stock (μℓ)	1X Assay buffer (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 그려줍니다.

**Nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Standard** : 1 mM Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Standard 50 μℓ와 1X Assay buffer 450 μℓ를 혼합하여 100 μM Standard solution을 만듭니다. 이를 1/2씩 Serial dilution하여 8 구간의 Standard solution을 아래 표와 같이 만들어 사용합니다.

STD No.	STD Stock	Vol. of STD Stock (μℓ)	1X Assay buffer (μℓ)	STD Concentration (μM)	Final STD Amount in well (nmol/well)
7	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Standard (1 mM)	50	450	100	5
6	STD No. 7	250	250	50	2.5
5	STD No. 6	250	250	25	1.25
4	STD No. 5	250	250	12.5	0.625
3	STD No. 4	250	250	6.25	0.3125
2	STD No. 3	250	250	3.125	0.15625
1	STD No. 2	250	250	1.5625	0.078125
Blank	0	0	250	0	0

\* 매 실험마다 Standard를 새로 그려줍니다.

## 실험 과정

- \* 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 진행하신 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.

### Total Nitric Oxide Assay

\* Nitrite와 Nitrate의 값을 각각 측정하기 위해서는 Nitrite Assay를 동시에 진행합니다.

- ① 준비된 Sample 2~50 μℓ를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 1X Assay buffer 로 50 μℓ가 되도록 조정합니다.
- ② 준비된 Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 및 Nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Standard solution을 각각 Well에 50 μℓ씩 분주합니다.
- ③ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 준비한 1X Nitrate Reductase와 1X Cofactor를 각각 25 μℓ 씩 분주합니다.
- ④ 빛을 차단하여 상온에서 1 h 동안 Incubation한 후 Sample well과 Standard well에 Enhancer를 10 μℓ 씩 분주합니다.
- ⑤ 빛을 차단하여 상온에서 10 min 간 Incubation한 후 Sample well과 Standard well에 Griess Reagent I 을 50 μℓ씩 첨가합니다.
- ⑥ Sample well과 Standard well에 Griess Reagent II를 50 μℓ씩 첨가합니다.
- ⑦ 빛을 차단하여 상온에서 10 min 간 반응시키고 Microplate reader로 흡광도 540 nm에서 측정합니다.

### Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) Assay

- ① 준비된 Sample 2~50 μℓ를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Volume은 1X Assay buffer 50 μℓ가 되도록 조정합니다.
- ② 준비된 Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) Standard solution을 각 Well에 50 μℓ 씩 분주합니다.
- ③ 1X Assay Buffer 를 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 μℓ 씩 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  $\text{NO}_2^-$ 와  $\text{NO}_3^-$ 의 양으로 다음 식을 이용하여 Sample 내  $\text{NO}_2^-$ 와  $\text{NO}_3^-$ 의 농도를 구합니다.

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

$$\text{NO}_2^- \text{ C } (\mu\text{M}) = \text{NO}_2^- \text{ B} \times \text{D}$$

$$\text{NO}_3^- \text{ C } (\mu\text{M}) = (\text{Total B} - \text{NO}_2^- \text{ B}) \times \text{D}$$

**Total C** : Sample의  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  농도 ( $\mu\text{M}$ )

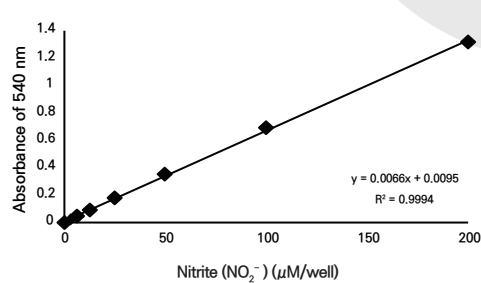
**Total B** : Total Nitric Oxide Assay로 측정한 Well의  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  농도 ( $\mu\text{M}$ )

**$\text{NO}_2^- \text{ C}$**  : Sample의  $\text{NO}_2^-$  농도 ( $\mu\text{M}$ )

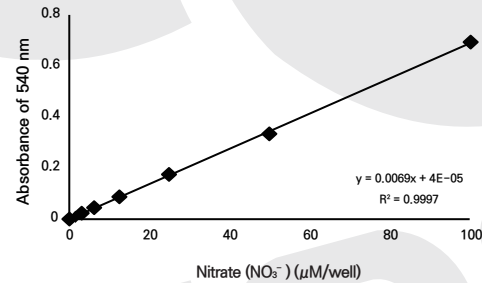
**$\text{NO}_2^- \text{ B}$**  : Nitrite Assay로 측정한 Well의 Sample 농도 ( $\mu\text{M}$ )

**$\text{NO}_3^- \text{ C}$**  : Sample의  $\text{NO}_3^-$  농도 ( $\mu\text{M}$ )

**D** : Sample 희석 배율



Nitrite standard curve (Colorimetric)



Nitrate standard curve (Colorimetric)

### Related products

BM-GRI-1000

PicoSens™ Griess Reagent Assay Kit (colorimetric)

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.