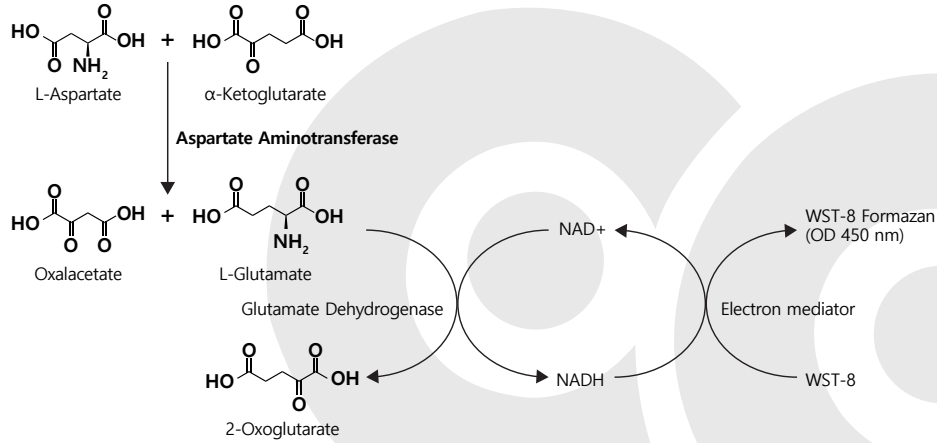


## PicoSens™ AST Assay Kit (Colorimetric)

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

### 실험 원리



Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT, SGOT)로도 알려져 있는 Aspartate aminotransferase(AST)는 Aspartate에서  $\alpha$ -Ketoglutarate로  $\alpha$ -Amino group을 전달하는 것을 촉매하여 Glutamate와 Oxaloacetate를 생성합니다. BIOMAX PicoSens™ AST Assay Kit (Colorimetric)는 Glutamate dehydrogenase가 AST에 의해 생성된 Glutamate를 2-Oxoglutarate로 전환하며 이때  $NAD^+$ 가  $NADH$ 로 환원됩니다.  $NAD^+$ 와  $NADH$ 의 산화 환원 순환 반응에서  $NADH$ 가 산화될 때 발생하는 수소원자와 WST-8이 반응하여 WST-8 Formazan을 형성하게 되고 이는 흡광도 450 nm에서 측정됩니다. 이를 통해 AST에 의해 생성된 Glutamate의 농도를 확인할 수 있으며, 이를 통해 AST 능력을 평가할 수 있습니다.

### 제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
10X AST Assay Buffer	25 mL	-20°C
AST Enzyme Mix	150 $\mu$ l	
AST Substrate Mix	1.5 mL	
AST Probe	1 mL x 3 vials	
AST Positive Control	50 $\mu$ l	
AST CoEnzyme	300 $\mu$ l	
AST Standard (100 mM)	100 $\mu$ l	

\* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 약 6개월간 안정적입니다.

### 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ D.W.
- ▶ Cold PBS
- ▶ Microtube
- ▶ 15 or 50 mL Conical tube
- ▶ Micro centrifuge (4°C)
- ▶ Colorimetric microplate reader (450 nm Filter / 37 °C)

### 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.
- ▶ **1X AST Assay buffer** : 10X AST Assay Buffer 5 mL과 D.W. 45 mL을 혼합하여 준비합니다. 사용 후 4°C 또는 -20°C에 보관하며 희석된 용액은 6개월 이내에 사용합니다.
- ▶ **AST Positive control** : 1X AST Assay buffer로 1:100 희석하여 사용하며, 사용량만큼만 제조하여 사용합니다. 사용 후 4°C 또는 -20°C에 보관하며 희석된 용액은 재사용을 권장하지 않습니다. (Well 당 사용량 50  $\mu$ l)  
ex) AST Positive Control 5  $\mu$ l + 1X AST Assay buffer 495  $\mu$ l
- ▶ **AST CoEnzyme solution** : 사용 후 -20°C 또는 -80°C에 보관하며 희석된 용액은 재사용을 권장하지 않습니다.
- ▶ **1 mM AST Standard** : AST Standard (100 mM)를 1X AST Assay buffer로 1:100 희석하여 최종 농도 1 mM로 만들어 사용합니다.  
ex) AST Standard (100 mM) 10  $\mu$ l + 1X AST Assay buffer 990  $\mu$ l

### Sample type

- Serum, Plasma
- Tissues
- Cell suspensions

## Sample preparation

모든 Sample은 Fresh한 상태이어야 하며, -80 °C에서 보관 하더라도 1~2 개월 이상 된 Sample을 측정할 시 결과값이 떨어질 수 있습니다. 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 하신 후 사용을 권장합니다.

- 측정 Sample의 Several dilution을 준비하여 실험을 진행합니다. 이때 1X AST Assay buffer로 희석합니다.
- 실험 후 보관 시 -80°C에서 보관합니다.

## Tissues

- ① Tissue (500~1000 mg)를 가위 또는 Dounce homogenizer 등으로 완전히 액화될 때 까지 다져줍니다.
- ② Cold PBS 또는 1X Assay buffer 2 mL을 넣고 Homogenize 또는 Sonication 한 후 10 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ③ 10 sec 동안 Vortexing 후 5 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ④ 4°C에서 12,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ⑤ Supernatant를 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.

## Cell suspensions

- ① Cell pellet (1 x 10<sup>6</sup> cells)에 Cold PBS 또는 1X Assay buffer 0.2 mL을 넣고 Homogenize 한 후 10 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ② 10 sec 동안 Vortexing 후 5 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ③ 4°C에서 12,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ④ Supernatant를 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.

## Serum

- ① Anticoagulant를 사용하지 않고 혈액 시료를 채혈합니다.
- ② 상온에서 30 min 동안 혈액 시료가 응고되도록 합니다.
- ③ 4°C에서 2,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ④ Serum 층을 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.  
- 이때 White buffy coat를 건들지 않도록 주의합니다.

## Plasma

- ① Heparin 또는 Sodium citrate를 사용하여 혈액 시료를 채혈합니다. (EDTA는 사용하지 마십시오.)
- ② 4°C에서 1,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ③ Plasma 층을 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.  
- 이때 White buffy coat를 건들지 않도록 주의합니다.

## Standard preparation

앞서 준비해 놓은 1 mM AST Standard 125  $\mu$ l와 1X AST Assay buffer 375  $\mu$ l 를 혼합하여 250  $\mu$ M STD No. 1을 만들어 1/2씩 Serial dilution하여 6구간의 Standard solution을 아래 표와 같이 만들어 사용합니다.

STD No.	STD Stock	Vol. of STD Stock ( $\mu$ l)	1X AST Assay buffer( $\mu$ l)	STD Concentration( $\mu$ M)	Final STD Amount in well (nmol/well)
1	1 mM AST Standard	125	375	250	12.5
2	STD No. 1	250	250	125	6.25
3	STD No. 2	250	250	62.5	3.13
4	STD No. 3	250	250	31.3	1.57
5	STD No. 4	250	250	15.6	0.78
Blank	-	-	250	0	0

## 실험 과정

- \* 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행 후 사용을 권장합니다.
- \* Duplicate 또는 Triplicate를 권장합니다.

- ① 준비한 Standard solution을 각 Standard well에 50  $\mu\text{l}$ 씩 분주합니다.
- ② 희석된 AST Positive Control을 Positive control well에 50  $\mu\text{l}$ 씩 분주합니다.
- ③ 준비된 Sample 50  $\mu\text{l}$ 를 Sample well에 분주합니다.
- ④ Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Reaction mix (150 $\mu\text{l}$ /well)
AST Enzyme Mix	1.5 $\mu\text{l}$
AST Substrate Mix	15 $\mu\text{l}$
AST Probe	30 $\mu\text{l}$
1X AST Assay buffer	103.5 $\mu\text{l}$

- \* 150  $\mu\text{l}$ /well 기준으로 Positive control, Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)

- ⑤ Reaction mix를 Standard, Positive control, Sample well에 150  $\mu\text{l}$  씩 분주합니다.
- ⑥ AST CoEnzyme solution을 아래와 같이 만들어 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Reaction mix (25 $\mu\text{l}$ /well)
AST CoEnzyme	2.5 $\mu\text{l}$
D.W.	22.5 $\mu\text{l}$

- \* 25  $\mu\text{l}$ /well 기준으로 Positive control, Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 AST CoEnzyme solution을 준비합니다. (사용 전 Spin-down)

- ⑦ AST CoEnzyme solution을 Standard, Positive control, Sample well에 25  $\mu\text{l}$  씩 분주합니다.
- ⑧ 즉시 Kinetic mode로 1 h ~ 2 h 동안 (37  $^{\circ}\text{C}$ ) Microplate reader로 흡광도 450 nm에서 측정합니다.

## 결과 분석

- AST 1 mU은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 min 당 1.0 nmole의 Glutamate를 생성하는 효소의 양입니다.
- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.
  - 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.
  - T1, T2 두 시간대에 OD1, OD2 를 선택합니다. (T2 > T1 > 10 min)  
이때, T1, T2 은 1 min 이상 차이되어야 하며, OD2 은 OD1 보다 커야합니다
  - T2 시간대에 Standard 흡광도 값으로 Standard curve를 그립니다.
  - OD1과 OD2 사이의 Sample 흡광도 값의 변화( $\Delta A$ )를 계산합니다. ( $\Delta A = \text{OD2} - \text{OD1}$ )
  - 각 Sample의  $\Delta A$ 를 Standard curve에 대입하여 분석 내에서 생성된 Glutamate의 양을 결정합니다.  
이때, 모든 Sample의 OD1, OD2,  $\Delta A$  값은 Standard curve 내의 값이어야 합니다.
  - 아래 방정식을 사용하여 Sample 내에 AST Activity를 결정합니다.

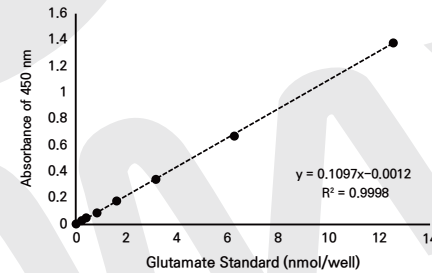
$$\text{AST Activity (mU/ml)} = \frac{B}{\Delta T \times 0.05 \text{ ml}} \times D$$

B : Sample의  $\Delta A$ 를 Standard curve에 대입하여 분석 내에서 생성된 Glutamate의 양 (nmol/well)

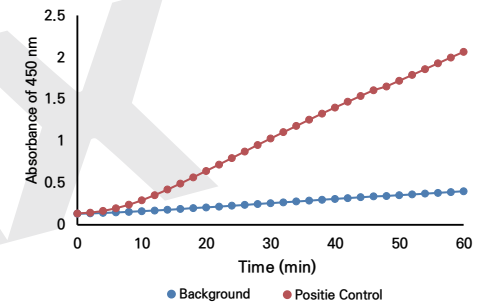
$\Delta T$  : 선택한 T2 와 T1 사이의 시간 변화량 ( $\Delta T = T2 - T1$ , min)

0.05 mL : 첨가한 Sample volume

D : Sample 희석 배율



Glutamate Standard Curve (0-12.5 nmol)



Kinetic activity curve using AST positive control

## Related products

- BM-ALT-100 PicoSens™ ALT Assay Kit (Colorimetric)
- BM-ALK-500 PicoSens™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Colorimetric)

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.