

# EZ- Nitric Oxide Assay Kit

Metabolism assay kit  
(Colorimetric)

Cat. No. DG-NO500

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

## ▪ Product Description

Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 citrulline으로 변환되는 동안 생성되는 라디칼 화합물입니다. Nitric oxide는 신경 전달, 혈관 조절, 면역 반응 및 세포 사멸에 중요한 역할을 합니다. 또한 대식세포 매개 세포독성에 영향을 미치는 분자로 작용하며 mitochondrial respiration과 DNA 합성을 억제하는 것으로도 알려져 있습니다.

EZ-Nitric Oxide Assay Kit는 diazotization (Griess method)분석을 기반으로 하여 시료의 NO 농도를 측정합니다. 본 키트는 조직이나 세포 내 존재하는 질산염( $\text{NO}_3^-$ )의 변환 형태인 아질산염( $\text{NO}_2^-$ )을 측정하여 질산염( $\text{NO}_3^-$ )의 농도를 정확하게 측정합니다. Sulfanilamide와 nitrite의 반응 부산물에 *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine 이 첨가될 때 일어나는 반응으로 Total NO를 정량 할 수 있습니다.

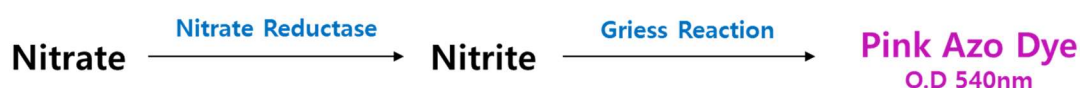


Fig 1. Nitrite quantification using the Griess reagent.

## ▪ Contents and Storage Conditions

Component	500 assay	Storage
Griess Reagent A	25 mL	4 °C,
Griess Reagent B	25 mL	
Nitrite Standard (2 mM)	500 µL X 2 vial	

\* 개봉 후 4°C에서 6개월간 안정합니다.

\* Griess reagent A, B를 미리 섞지 말고 사용 전 혼합하여 사용하십시오.

## ▪ General Protocol

### Sample preparation

#### **Note**

- Sample에 단백질이 포함된 경우 0.2  $\mu\text{m}$  필터로 필터 후 실험에 사용합니다.

#### ● Serum/Plasma

- ① 필터를 사용해 시료의 단백질을 제거합니다.
- ② 4 °C, 10,000 x g에서 10분 동안 샘플을 centrifuge하여 상층액만 분석에 사용합니다.

#### ● Urine

- ① PBS를 사용하여 샘플을 10배 이상 희석해 필터 후 바로 사용합니다.
- ② 보다 정확한 측정을 위해 PBS를 사용하여 여러 농도의 sample을 준비하십시오.

#### ● Cell lysate

- ① 100  $\mu\text{l}$ 의 얼음처럼 차가운 PBS로 세포( $1 \times 10^6$ )를 신속하게 균질화 합니다.
- ② 얼음에 10분 담근 후 4 °C에서 10,000 x g로 5분 centrifuge하고 상층액을 새 튜브로 옮깁니다.
- ③ Well 당 10 ~ 100  $\mu\text{l}$ 의 sample을 첨가하고 PBS를 추가하여 total volume을 100  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하여 sample로 사용합니다.

#### ● Culture supernatant

- ① Nitrite 함량이 포함된 배지는 피합니다.
- ② 필터 없이 culture supernatant 100  $\mu\text{l}$ 를 96-well plate에 옮긴 후 sample로 바로 사용하여 분석합니다.
- ③ 색이 진한 배지 사용 시 nitrite standard solution을 동일한 배지를 사용하여 희석한 후 standard curve를 준비합니다.

### Nitrite standard preparation

: 2 mM nitrite solution과 D.W를 아래와 같이 dilution하여 nitrite standard solution을 준비합니다.

Standard Tube No.	Nitrite standard solution	D.W	Final standard Nitrite Conc. ( $\mu\text{M}$ )
1	50 $\mu\text{l}$ of 2 mM (2000 $\mu\text{M}$ )	450 $\mu\text{l}$	200
2	250 $\mu\text{l}$ of Tube # 1	250 $\mu\text{l}$	100
3	250 $\mu\text{l}$ of Tube # 2	250 $\mu\text{l}$	50
4	250 $\mu\text{l}$ of Tube # 3	250 $\mu\text{l}$	25
5	250 $\mu\text{l}$ of Tube # 4	250 $\mu\text{l}$	12.5
6	250 $\mu\text{l}$ of Tube # 5	250 $\mu\text{l}$	6.25
7	250 $\mu\text{l}$ of Tube # 6	250 $\mu\text{l}$	3.125
8	0 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	0

\* Standard는 매 실험 시 함께 측정하는 것을 권장합니다.

\* Nitrite standard solution과 sample은 농도별로 duplicate 이상 test 할 수 있도록 최소 250  $\mu\text{l}$ 가 되도록 준비합니다.

### Nitric Oxide (Griess Reagent) Assay

- ① 실험 전 Griess reagent A, B를 약 15 ~ 30분 동안 실온 보관 후 사용합니다.
- ② Nitrite standard solution과 sample을 농도별로 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어줍니다.
- ③ 모든 well에 Griess reagent A 50  $\mu\text{l}$  첨가해 실온에서 차광하여 10분 반응시킵니다.
- ④ Griess Reagent B 50  $\mu\text{l}$  첨가한 후 다시 실온에서 차광하여 10분 반응시킵니다
- ⑤ 반응이 끝난 plate는 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도 측정하며, 해당 파장이 없을 경우 520 ~ 550 nm에서 측정합니다.

## ▪ Calculation

### Nitrite concentration of sample (μM)

1. 모든 측정값에서 blank의 O.D. 값을 보정해줍니다.  
\* Blank = O.D<sub>540nm</sub> from Nitrite standard No. 8 (0 μM Nitrite)
2. Nitrite standard의 농도(X 축)에 대한 O.D. 값(Y축)을 이용하여 표준곡선을 그려 선형 방정식을 구합니다.
3. Standard curve에 sample 측정값 수치를 대입하여 Nitrite양을 계산하여 줍니다.  
\* Background control을 설정한 경우 sample 측정값에서 background control 측정값을 뺀 수치를 대입하여 Nitrite 양을 계산하여 줍니다.  
\* Sample을 2배 희석했을 시에 계산된 nitrite (μM)에 x2를 하여 정확한 nitrite의 양을 계산합니다.

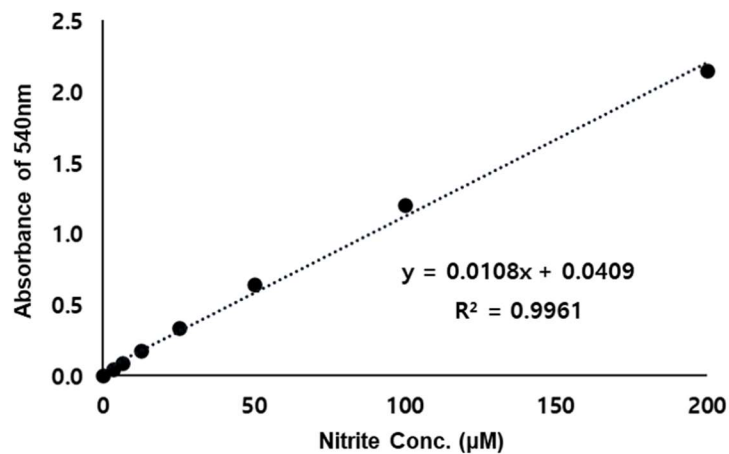


Fig 2. Nitrite standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

## ▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
<b>Oxidative Stress Assay Kit</b>	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
<b>Metabolism Assay Kit</b>	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay