

EZ- Free Glycerol Assay Kit

Metabolism assay kit
(Colorimetric/Fluorometric)

Cat. No. DG-FGC100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Glycerol($C_3H_8O_3$)은 Triglyceride의 주성분으로 지방의 주된 저장 형태입니다. 생체내에서는 산화와 생합성 과정 등이 포함된 에너지 대사 과정에서 주요 성분으로서의 역할을 하고, 산업에서는 음료, 용제, 제약 그리고 화장품 등 광범위하게 사용됩니다. 생리 조건하에서 triglyceride는 lipolysis과정을 통해 glycerol과 free fatty acid로 가수분해 되는데 Free fatty acid와는 달리 Glycerol은 지방 조직에서 재사용되지 않습니다.

EZ-Free Glycerol Assay Kit는 다양한 시료에서 free glycerol의 농도를 측정하는 민감하고 쉬운 분석법을 제공합니다. 분석에서 Glycerol은 효소적으로 산화된 생성물이 probe와 반응하여 흡광 ($\lambda = 570 \text{ nm}$) 및 형광 ($Ex/Em = 535/590 \text{ nm}$)을 측정할 수 있게 합니다.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage (reconstituted)
Glycerol Assay buffer	25 mL	-	-20°C, 2개월
Glycerol Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20°C, 2개월
Glycerol Probe	200 μL	Yellow	-20°C, 2개월
Glycerol Standard (100 mM)	100 μL	Green	-20°C, 2개월

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안 됩니다.

* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 100 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 100개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이 중 standard, blank, sample당 duplication 처리 등을 고려하면 실제 테스트 가능한 시료의 숫자는 20~40 samples의 범위에 있습니다. 제품설명서를 자세히 검토하고, 테스트하고자 하는 sample의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

■ Preparation of Reagent

Component	Preparation	Storage and Stability
Glycerol Enzyme mix (Lyophilized)	220 μL Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2개월 동안 안정합니다.
Glycerol Probe	상온에서 충분히 녹여서 사용합니다.	사용하고 남은 용액은 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오.
Glycerol Standard	상온에서 충분히 녹여서 사용합니다.	사용하고 남은 용액은 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오.

* Assay buffer는 실험 전 상온에서 충분히 warming up 한 후 사용하십시오.

* 차가운 상태의 buffer를 사용시 enzyme 활성이 억제되어 측정결과에 영향을 줄 수 있습니다.

■ General Protocol

1. Sample preparation

준비된 sample을 96 well plate에 2-50 μL 넣은 후, 최종 volume은 assay buffer로 50 μL 가 되도록 조정합니다. ($n \geq 2$)

1) Serum sample

Carrez reagent(별도구매)를 사용하여 단백질과 지방성분의 항산화 물질을 미리 제거합니다.

2) Cell or Tissue

- ① ~ 2 x 10⁶ cells 또는 ~ 10 mg tissue sample을 준비합니다.
- ② PBS를 이용하여 sample을 washing 해줍니다.
- ③ Sample에 Glycerol Assay buffer 용액 500 μL 을 넣고 얼음에서 균질화(homogenization)합니다.
- ④ 10,000xg로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분석에 사용합니다.

* 특정 세포 및 특정 조직의 경우 Carrez reagent (별도구매)처리가 필요할 수도 있습니다.

3) Urine sample : 전 처리 없이 분석이 가능합니다.

4) 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정 값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.

5) 높은 background를 갖는 시료의 경우 측정에 사용한 동일 양의 시료를 background control로 준비합니다.

2. Standard preparation

1) Colorimetric method

: 100 mM Glycerol standard solution 10 μl 와 distilled water 990 μl 를 혼합하여 1mM standard solution을 만듭니다. 이를 96 well plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 를 각각 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50 μl 로 조정하면 각 plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/well 의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 1mM Glycerol Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Glycerol Conc. (nmol/well)
1	0 μl	50 μl	50 μl	0
2	2 μl	48 μl	50 μl	2
3	4 μl	46 μl	50 μl	4
4	6 μl	44 μl	50 μl	6
5	8 μl	42 μl	50 μl	8
6	10 μl	40 μl	50 μl	10

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

2) Fluorometric method

100 mM Glycerol standard solution 10 μl 와 distilled water 990 μl 를 혼합하여 1mM standard solution을 만듭니다. 1 mM Glycerol standard solution 100 μl 와 distilled water 900 μl 를 혼합하여 0.1 mM standard solution을 만듭니다. 이를 96 well plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 를 각각 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50 μl 로 조정하면 각 plate에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 nmol/well 의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 0.1mM Glycerol Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Glycerol Conc. (nmol/well)
1	0 μl	50 μl	50 μl	0
2	2 μl	48 μl	50 μl	0.2
3	4 μl	46 μl	50 μl	0.4
4	6 μl	44 μl	50 μl	0.6
5	8 μl	42 μl	50 μl	0.8
6	10 μl	40 μl	50 μl	1

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

3. Reaction mixture preparation

1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay 양을 계산하여 여유 있게 reaction mixture를 준비합니다.

1) Colorimetric method

Components	Reaction mixture	Background mixture
Glycerol Assay buffer	46 μl	48 μl
Glycerol Enzyme mix	2 μl	-
Glycerol Probe	2 μl	2 μl
Total	50 μl	50 μl

2) Fluorometric method

Components	Reaction mixture	Background mixture
Glycerol Assay buffer	47.6 μl	49.6 μl
Glycerol Enzyme mix	2 μl	-
Glycerol Probe	0.4 μl	0.4 μl
Total	50 μl	50 μl

4. Reaction mixture를 Glycerol standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50 μl 씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

* background control 을 준비한 경우에는 background control well에 background mixture를 넣어줍니다.

5. Plate를 빛이 차단된 실온에서 30분간 반응시킨 후, 부드럽게 shaking 하여 microplate reader로 측정합니다.

1) Colorimetric : 570 nm

2) Fluorometric: (Excitation/Emission): 535 nm / 595 nm

▪ Calculation

1. 모든 측정값에서 standard 1 값(blank)을 뺍니다.
2. 각 standard well과 sample well의 duplicate 측정값을 평균합니다.
3. Glycerol standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.
4. Standard curve에 sample 측정값 수치를 대입하여 Glycerol 양을 계산합니다.

* Background control을 설정한 경우 sample 측정값에서 background control 측정값을 뺀 수치를 대입하여 Glycerol 양을 계산합니다.

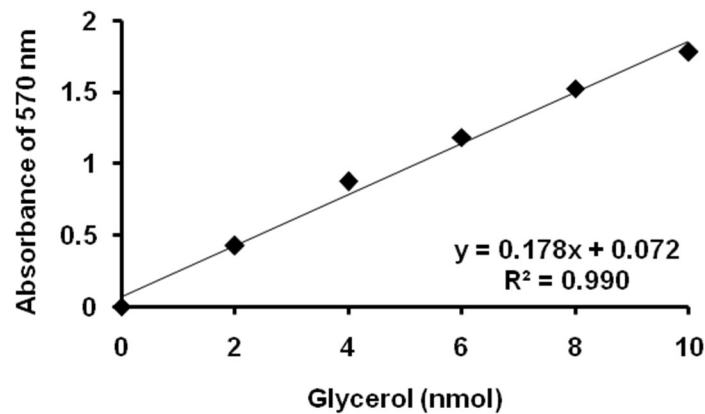
5. 4에서 계산된 Glycerol 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Glycerol의 농도를 계산합니다.

$$\text{시료 내 Glycerol 농도 (C)} = B/V \times D \text{ (nmol/}\mu\text{l or mM)}$$

B : Standard curve로부터 구한 측정 well의 Glycerol의 양 (nmol)

V : well에 분주한 시료의 양 (μl)

D : 샘플 희석배율 (2배 희석한 경우 x1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)



Glycerol standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	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
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	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/VLDL 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
	EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay

