

EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-ABT400

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

ABTS 측정은 potassium persulfate 와 반응하여 생성된 ABTS⁺ 형태의 양이온 라디칼이 항산화 물질에 의해 환원되는 원리를 이용합니다. 같은 원리의 다른 항산화 측정법인 DPPH assay 보다 pH 의 영향이 적은 장점이 있습니다.

ABTS assay 와 DPPH assay 는 항산화에 의해 라디칼이 소거되는 원리는 동일하지만 기질과 반응 물질의 결합 정도에 따라 경향성이 다르게 나올 수 있습니다.

따라서 정확한 측정을 위해서는 ABTS assay(DG-ABT400, DoGENBio)와 DPPH assay(DG-DPH400, DoGENBio)를 함께 사용하는 것을 권장합니다.

EZ-ABTS Antioxidant Assay kit 는 ABTS 가 양이온 형태에서는 청록색을 띄며, 항산화물질과 반응하였을 때 무색으로 변하는 특성을 가지고 있어 732 nm 에서 colorimetric 방법으로 측정합니다.

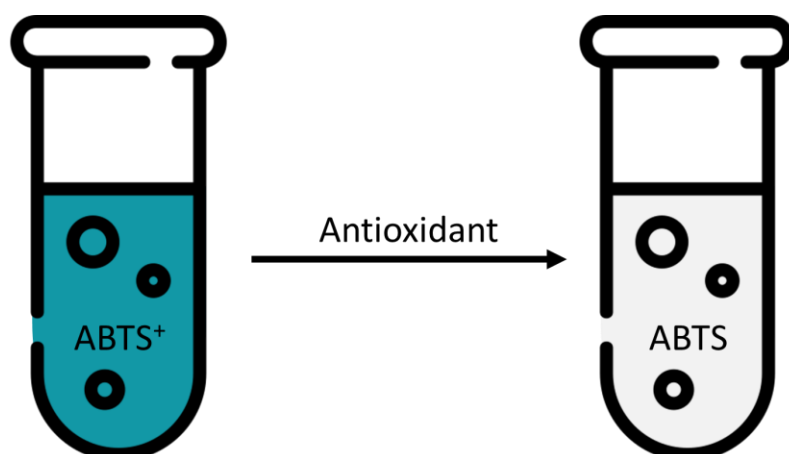


Fig. Reduction of radical ABTS by antioxidants.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	400 assay	Storage
ABTS Reagent	4 vials	4 °C
2X Assay Buffer	25 mL X 2	
Trolox Standard (1 mM)	4 vials	

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

* 2X Assay Buffer 는 사용 전 실온에서 충분히 놓아둔 후 사용하십시오.

* ABTS Reagent 는 사용하기 직전에 준비하고 사용 후 재사용할 수 없습니다.

▪ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
2X Assay Buffer	2X Assay Buffer 11 ml과 D.W 11 ml을 섞어 준비합니다. <i>* 96-well plate 1 판 기준.</i>	-
ABTS Reagent	1X Assay Buffer 600 μ l를 넣은 후 완전히 녹입니다. 녹인 ABTS Reagent 는 1X Assay Buffer 20 ml에 넣어 ABTS Reagent Solution 을 준비합니다.	ABTS Reagent 는 Assay Buffer 를 넣은 후 24 시간 안에 사용하십시오. 사용 전에 준비하고, 준비된 용액은 빛으로부터 차단 후 사용하십시오.
Trolox Standard	Ethanol 1 ml 넣어 부드럽게 inverting 하며 잘 섞어줍니다.	Trolox 에 ethanol 을 넣은 후 24 시간 안에 사용 하십시오.

* 본 Kit 사용 시 사용되는 Ethanol(anhydrous), Proteinase K(예 : Merck, P2308)는 별도 구매하여 사용하십시오.

* 본 protocol 은 96-well plate 를 이용하여 실험/측정하도록 최적화 되어있습니다.

* ABTS Reagent 가 완전히 녹았는지 확인 후 사용하십시오.

▪ General Protocol

Sample preparation

Note

- Sample 추출은 방법과 양이 다를 수 있습니다. 따라서 희석률도 다를 수 있습니다.
 - 부드러운 Sample(ex. 과일류, 야채류 등): 다지거나 분쇄하여 추출 후 사용.
 - 그 외 단단한 Sample(ex. 씨앗, 뿌리, 건조된 식물재료 등): homogenization 혹은 sonication 하여 추출 후 사용.
- 모든 샘플의 농도를 측정하였을 때 O.D 값이 Standard Curve 안에 포함되어야 합니다. 따라서, 샘플을 여러 농도로 준비하여 실험을 진행하십시오.
- 열에 불안정한 sample 은 ICE 위에서 실험을 진행하십시오.
- Sample 에 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 성분이 포함되어 있을 시 측정이 되지 않을 수 있습니다.
- Sample 내 입자가 있거나 색이 있을 경우 정확한 측정이 어렵습니다.

1. Serum

- ① Serum 285 μl 와 Proteinase K (20 mg/ml) 15 μl 를 microtube 에 넣습니다.
- ② 37 °C에서 45 분 간 반응시킨 후 다시 90 °C에서 10 분 더 반응시킵니다.
- ③ 4°C, 12,000 x g 에서 60 분 간 centrifuge 후 상층액만 사용합니다.

2. Fruits, vegetables, other foods and plants

- ① Sample 100 mg에 1X Assay Buffer 500 μl 를 넣어 vortexing 을 충분히 한 후 10,000 x g 에서 10 분 간 centrifuge 하고 상층액을 사용합니다.
- ② 보다 정확한 측정을 위해 1X Assay Buffer 를 사용하여 여러 농도의 sample 을 준비하십시오.

3. Liquid Sample (Beverages including juices, wines, teas and others)

- ① 0.2 μm 필터를 이용하여 sample 을 여과시켜 바로 사용합니다.
- ② 보다 정확한 측정을 위해 1X Assay Buffer 를 사용하여 여러 농도의 sample 을 준비하십시오.

Standard preparation

1 mM Trolox Standard Solution 0, 40, 80, 120, 160 μl 를 e-tube 에 분주 후 Ethanol 을 첨가하여 Final volume 을 400 μl 로 조정합니다.

Standard No.	1mM Trolox Standard Solution	Ethanol	Final volume	Trolox Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	0 μl	400 μl	400 μl	0
2	40 μl	360 μl	400 μl	25
3	80 μl	320 μl	400 μl	50
4	120 μl	280 μl	400 μl	75
5	160 μl	240 μl	400 μl	100

* Standard 는 매 실험 시 함께 측정하는 것을 권장합니다.

ABTS Radical Scavenging Activity Assay

: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)는 Sample 에 대한 EC_{50}^* 값으로 나타냅니다. (EC_{50}^* : ABTS radical 이 50% 소거되는 농도)

	Trolox Standard	Sample	Sample Blank	Blank 1	Blank 2
Trolox Standard Solution	20 $\mu\ell$				
Sample		20 $\mu\ell$	20 $\mu\ell$		
Ethanol				20 $\mu\ell$	20 $\mu\ell$
1X Assay Buffer			180 $\mu\ell$		180 $\mu\ell$
ABTS Reagent Solution	180 $\mu\ell$	180 $\mu\ell$		180 $\mu\ell$	

* Blank 1 : without antioxidant,

Blank 2 : ethanol blank,

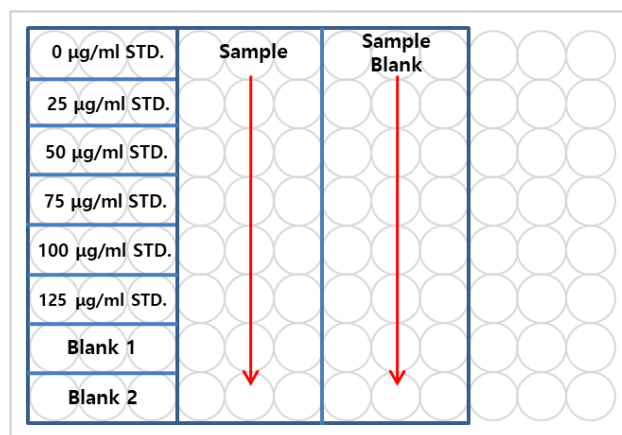
Sample Blank : sample background blank.

* Sample 의 색이 진할 경우 sample blank 로 보정합니다.

* ABTS Reagent Solution 을 넣는 순간부터 반응이 시작되기 때문에 맨 마지막에 넣어 반응시킵니다.

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample 은 농도별로 duplicates 이상으로 준비하세요.

- ① Trolox Standard, Sample 과 Sample Blank 에 농도별로 각 well 에 20 $\mu\ell$ 씩 넣습니다.
- ② Blank 1, 2 에 ethanol 20 $\mu\ell$ 를 넣습니다.
- ④ Blank 2, Sample Blank 에 1X Assay Buffer 180 $\mu\ell$ 를 넣습니다.
- ⑤ Trolox Standard, Sample 및 Blank 1 에 ABTS Reagent Solution 180 $\mu\ell$ 을 넣고 Plate shaker 혹은 pipette 으로 잘 섞어줍니다.
- ⑥ Plate 를 빛이 차단된 실온 (25°C)에서 10 분간 반응시킵니다.
- ⑦ 반응이 끝난 plate 는 plate reader 를 사용하여 732 nm 에서 흡광도를 측정합니다.



Calculation

모든 결과 값은 duplicates 이상 준비하며, 평균값을 가지고 계산합니다.

계산 예시

- ① Sample, Sample Blank 값의 평균을 계산합니다.

반응농도	Sample	
	Sample	Sample BLK
125	0.214	0.032
100	0.277	0.032
75	0.320	0.034
50	0.360	0.032
25	0.409	0.033
0	0.487	0.032
BLK1	0.661	0.000
BLK2	0.031	

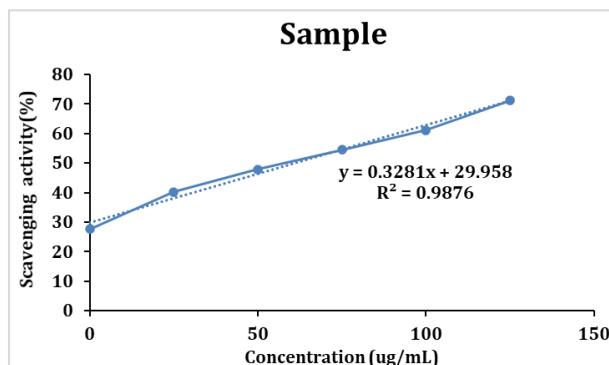
- ② Sample에서 각 농도에 해당하는 Sample Blank 값을 뺀 **A**를 구하고, Blank 1에서 Blank 2 값을 빼 **B**를 계산합니다.

반응농도	Sample			
	Sample	Sample BLK	A	SA(%)
125	0.214	0.032	=T28-U28	71.2
100	0.277	0.032	0.245	61.2
75	0.320	0.034	0.286	54.6
50	0.360	0.032	0.328	47.9
25	0.409	0.033	0.376	40.3
0	0.487	0.032	0.456	27.7
Blank1	0.661	0.000	B	
Blank2	0.031		=T34-T35	

- Scavenging activity (SA, %)를 구하기 위해 앞에서 구한 **A**와 **B**의 값을 가지고, 다음 식을 이용하여 계산합니다.
- SA (%) : $100 - (A/B) * 100$**

반응농도	Sample			
	Sample	Sample BLK	A	SA(%)
125	0.214	0.032	=100-(V28/V35)*100	
100	0.277	0.032	0.245	61.2
75	0.320	0.034	0.286	54.6
50	0.360	0.032	0.328	47.9
25	0.409	0.033	0.376	40.3
0	0.487	0.032	0.456	27.7
Blank1	0.661	0.000	B	
Blank2	0.031		0.630	

- ③ Sample의 농도별 값과 SA (%) 값으로 분산형 그래프를 나타낸 후 추세선을 사용하여 수식 및 R² 값을 표시합니다.



✓ **Total Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)**

- EC₅₀ 은 scavenging activity(%) 그래프에서 $y=ax+b$ 식에 y 에 50 을 대입하여 ABTS radical 을 50% 제거하는 Trolox 농도를 구할 수 있습니다.
- Sample 의 농도별 흡광도값을 측정 후 계산하여 scavenging activity(%) 그래프를 활용해 sample 의 EC₅₀ 을 구할 수 있습니다.
- TEAC 는 아래 공식을 이용하여 구합니다.

$$\text{TEAC} = \text{Trolox EC}_{50} / \text{Sample EC}_{50}$$

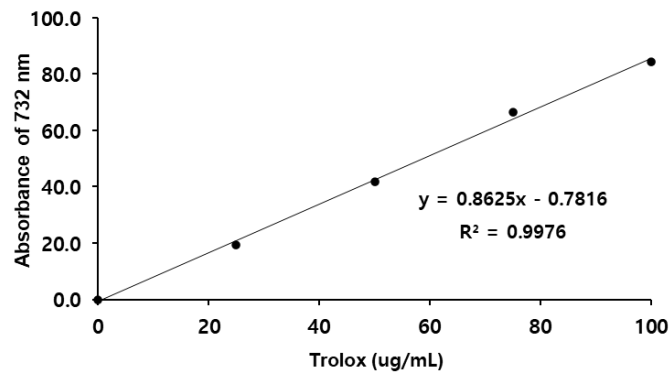


Fig. Trolox standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ 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-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	