

EZ-Triglyceride Quantification

Assay Kit

Metabolism assay kit
(Colorimetric/Fluorometric)

Cat. No. DG-TGC100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Triglyceride(TG)는 식물성기름, 동물성지방, LDL 및 VLDL의 주성분으로 에너지원으로 사용되거나 지방산의 운반체로써 중요한 역할을 합니다. TG는 fatty acid과 glycerol로 분해되며, 후에 에너지 생성 및 대사경로의 기질로 작용할 수 있습니다. TG로 인한 고혈압은 체장염 뿐만 아니라 죽상동맥경화증, 심장질환 및 뇌졸중과 관련 있습니다.

EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit는 다양한 시료에서 triglyceride, monoglyceride 및 diglyceride의 농도를 측정하기 위해 민감하고 쉬운 분석법을 제공합니다. 분석에서 TG는 free fatty acid과 glycerol로 분해됩니다. 그 다음 glycerol을 산화시킨 후 생성된 부산물(H_2O_2)는 probe와 반응하여 흡광(O.D. 570 nm) 및 형광 (Ex/Em = 535/590 nm)을 생성합니다.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage
Triglyceride Assay buffer	25mℓ	-	-20°C
Triglyceride Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20°C
Lipase (Lyophilized)	1 vial	Blue	-20°C
Triglyceride Probe	200μℓ	Yellow	-20°C
Triglyceride Standard (1 mM)	300μℓ	Green	-20°C

* 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.

▪ Sample type

동물 조직, 배양세포(adipocytes), 혈청이나 혈장 등의 샘플에서 Triglyceride의 농도를 측정하고 이를 통해 지질 대사과정을 분석할 수 있습니다.

▪ Preparation of Reagent

Component	Preparation	Storage and Stability
Triglyceride Enzyme mix (Lyophilized)	220 μl Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20 °C에서 2개월 동안 안정합니다.
Lipase (Lyophilized)	220 μl Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20 °C에서 2개월 동안 안정합니다.
Triglyceride Probe	실온에서 충분히 녹인 후 사용합니다.	사용하고 남은 용액은 -20 °C에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오.
Triglyceride Standard	냉동보관시 aqueous phase가 분리될 수 있습니다. 사용 전 37 °C에서 5분 동안 녹인 후 vortexing 하십시오. 용액의 상태가 투명하여 triglyceride가 완전히 섞인 것을 반드시 확인하십시오.	사용하고 남은 용액은 -20 °C에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오.

▪ 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

전처리 없이 바로 분석을 진행합니다.

2) Cell or Tissue (non-aqueous samples)

- ① ~ 1×10^6 cells 또는 ~ 100 mg tissue sample을 준비합니다.
- ② PBS를 이용하여 sample을 washing 해줍니다.
- ③ sample에 5 % NP-40 (in D.W.) 1 ml을 넣고 얼음 위에서 homogenization 합니다.
- ④ 80-100 °C에서 2-5분간 또는 용액이 불투명해질 때까지 가열 후 실온에서 충분히 식혀줍니다.
- ⑤ 한 번 더 가열하여 모든 triglyceride를 용해시켜줍니다.
- ⑥ 10,000xg 로 2분간 centrifuge 후 불용성 물질을 제거하고 분석 전 sample을 D.W.로 10배 희석합니다.

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

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

5) Endogenous 화합물들은 반응을 방해할 수 있으므로 triglyceride를 정확하게 측정하려면 Triglyceride standard 일정량(4 nmol)을 sample에 넣어 spike test를 권장합니다.

2. Standard preparation

1) Colorimetric method

1 mM triglyceride standard를 96 well plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 를 분주한 후 assay buffer로 final volume을 50 μl 로 조정하면 각 plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/well의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 1mM Triglyceride Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Triglyceride 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

1 mM triglyceride standard 10 μl 와 assay buffer 90 μl 를 혼합하여 0.1 mM standard solution을 준비하고 각 well에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 를 분주합니다. assay buffer로 final volume을 50 μl 로 조정하면 각 plate에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 nmol/well의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 0.1mM Triglyceride Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Triglyceride 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	1.0

- * 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.
- * Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

3. Lipase

각 standard와 sample well에 Lipase를 2 μl 씩 넣어주고 실온에서 20분간 반응시킵니다.

* background control well에는 Lipase를 넣지 마시고, Assay buffer 를 2 μl 씩 넣어줍니다.

4. Reaction mixture preparation

1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay양을 계산하여 여유 있게 reaction mix를 준비합니다.

1) Colorimetric method

Components	Reaction mixture
Triglyceride Assay buffer	46 μl
Triglyceride Enzyme mix	2 μl
Triglyceride Probe	2 μl
Total	50 μl

2) Fluorometric method

Components	Reaction mixture
Triglyceride Assay buffer	47.6 μl
Triglyceride Enzyme mix	2 μl
Triglyceride Probe	0.4 μl
Total	50 μl

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

* background control 을 준비한 경우 background control well에도 넣어줍니다.

6. 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 값을(blank) 빼줍니다.
2. 각 standard well과 sample well의 duplicate 측정값을 평균합니다.
3. triglyceride standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.
4. Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 sample내의 triglyceride 양을 계산하여 줍니다.

* Background control을 설정한 경우 sample 측정값 에서 background control 측정값을 뺀 수치를 대입하여 triglyceride 양을 계산하여 줍니다.

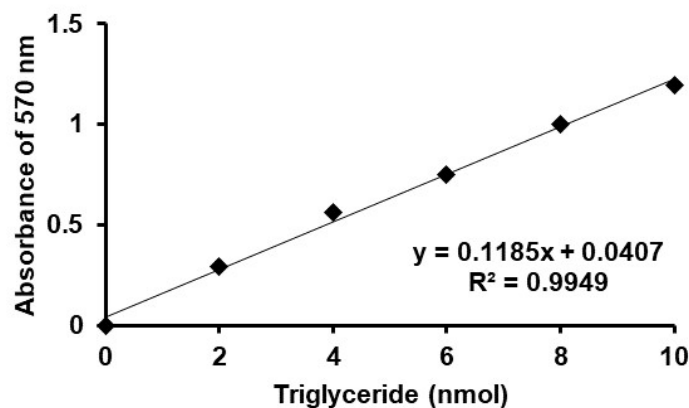
5. 4에서 계산된 sample 내의 triglyceride 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 시료 내 triglyceride 의 농도를 계산하여 줍니다.

샘플 내 Triglyceride 농도 (C) = B/V x D (nmol/ μ l or mM)

B : Standard curve로부터 구한 측정 well의 triglyceride 의 양(nmol)

V: well에 분주한 시료의 양 (μ l)

D: 샘플 희석배율 (2배희석한경우 x1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)



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

※ Spike sample : 샘플내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들어 Triglyceride 가 실제로는 2 ng이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 1.6ng (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다. 이러한 현상을 보정하기 위해 샘플과 별도로 샘플에 일정량의 Triglyceride(standard물질 사용)를 첨가한 well을 따로 설정하여 그 결과 값을 통해 실제 샘플의 농도를 보정하는 방법입니다. 이 실험에서 spike sample을 이용한 경우 위 농도 계산식은 다음과 같이 정리됩니다.

샘플 내 Triglyceride 의 양(B) = $OD1 / (OD2 - OD3) \times \text{Triglyceride spike (nmol)}$

OD1 : Sample 의 OD값 (blank corrected)

OD2 : Spiked sample의 OD값 (blank corrected)

OD3 : Sample의 OD값 (blank corrected)

Triglyceride spike : 샘플에 넣은 Triglyceride spike의 양

(*Triglyceride 분자량 : 885.4 g/mol)

▪ 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

