

EZ- Glucose Assay Kit

Metabolism assay kit
(Colorimetric/Fluorometric)

Cat. No. DG-GCS100

FOR RESEARCH USE ONLY.




NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Glucose (포도당, $C_6H_{12}O_6$, FW: 180.16)은 보편적인 에너지 분자인 ATP를 생성하는데 사용되는 주요 생물학적 연료 원입니다. 포도당은 많은 대사 질환의 주요 지표로서 그 측정은 연구 및 약물 발견 과정 모두에서 매우 중요합니다.

EZ- Glucose Assay Kit는 다양한 생물학적 시료 (예: 혈청, 혈장, 다른 체액, 식품, 성장 배지 등)에서 포도당을 직접 측정합니다. Glucose Enzyme Mix는 Glucose만을 선택적으로 산화 시키며, 그 부산물이 probe와 반응하여 흡광 (OD 570 nm) 및 형광 (Ex/Em = 535/590 nm)을 유도합니다. 이 방법은 신속하고 간단하며 민감하여 대량의 샘플을 처리하는데 적합 하며, 단백질 발현 과정에서 포도당 소비량을 모니터 하거나 발효공정에서 포도당 수준을 측정하는 방법으로도 사용할 수 있습니다.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Storage
Glucose Assay buffer	25mℓ	-20°C
 Glucose Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	-20°C
 Glucose Probe	200μℓ	-20°C
 Glucose Standard (100mM)	100μℓ	-20°C

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

* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 100 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 약 100 개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이중 Standard, Duplication 처리 등을 고려하면 실제 처리 가능한 시료의 숫자가 적을 수 있습니다. 제품 설명서를 자세히 검토하시고 테스트하고자 하는 샘플의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

* Sample측정값이 standard curve의 가장 높은 구간에 위치하는 경우는 sample을 희석하여 적정 구간에 위치하도록 조정하십시오

▪ Sample type

Serum, Plasma, Urine등의 체액 샘플, 식품, 배양액 등 다양한 생물학적 샘플에서 glucose의 농도를 측정하거나 탄수화물 대사과정을 분석할 수 있습니다.

▪ Preparation of Reagent

Component	Preparation	Storage and Stability
Glucose Assay buffer	사용시에는 실온에서 충분히 녹인 후 사용하기 바랍니다. <u>차가운 상태의 buffer 사용시</u> <u>활성이 억제되어 결과에 영향을</u> <u>줄 수 있습니다.</u>	사용하시고 남은 용액은 -20°C에 보관하십시오.
Glucose Enzyme mix (Lyophilized)	Enzyme mix 1vial에 Assay buffer 220 μ l를 첨가하여 녹인 후 pipetting up-down으로 잘 섞어 완전히 용해합니다.	용해한 용액은 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하실 수 있으나 2개월 이내에 사용하십시오.
Glucose Probe	사용시에는 실온에서 충분히 녹인 후 사용하기 바랍니다.	빛을 차단하여 -20°C 보관할 수 있으나 2개월 이내에 사용하십시오.
Glucose Standard	사용시에는 실온에서 충분히 녹인 후 사용하기 바랍니다.	사용하시고 남은 용액은 -20°C에 보관할 수 있으나 2개월 이내에 사용하십시오.

▪ General Protocol

1. Sample preparation

준비된 sample을 96 well plate에 2-50 μ l 넣은 후, 최종 volume은 assay buffer로 50 μ l가 되도록 조정합니다. (n \geq 2)

1) Urine

- 바로 분석에 사용하셔도 됩니다.

2) Serum

- Sample 양을 0.5 ~2.0 μ l로 제한된 범위에서 사용하십시오.
- 정상적인 serum 에는 ~5 nm/ μ l 포도당이 포함되어 있습니다.

3) Saliva

- 14,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 실험하십시오.

4) Milk

- ① 600 μl milk sample과 100 μl 6N HCl을 혼합하여 줍니다.
- ② 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취합니다.
- ③ mL 당 170 μl 6N NaOH를 처리한 후 140,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취하여 실험합니다.

5) 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우

- 측정값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.

6) 높은 Background를 갖는 시료

- 측정에 사용한 동일 양의 시료를 sample background control로 준비합니다.

7) Spike Test

- Endogenous 화합물들은 반응을 방해할 수 있으므로 glucose를 정확하게 측정하려면 glucose standard 일정량 (4 nmol)을 sample에 넣어 spike test를 권장합니다.

8) Enzyme을 포함하는 시료

- Endogenous enzyme이 활성 유지를 위해 포도당을 소모할 수도 있으므로 샘플에서 이를 제거할 필요가 있습니다. 활성을 갖는 enzyme을 포함하는 모든 시료는 10 kDa spin column을 사용하여 deproteinization해야 합니다.

2. Standard preparation

1) Colorimetric method

- (1) 100 mM Glucose standard 10 μl 와 assay buffer 990 μl 를 혼합하여 1 mM Glucose standard solution을 준비합니다.
- (2) 96 well plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 를 분주합니다.
- (3) Assay buffer로 final volume을 50 μl 로 조정하면 각 plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 mol/well의 standard set가 만들어집니다.

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

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것이 좋습니다.

2) Fluorometric method

- (1) 100 mM Glucose standard 10 μ l와 assay buffer 990 μ l를 혼합하여 1 mM Glucose standard solution을 준비합니다.
- (2) 1 mM Glucose standard solution 50 μ l 와 assay buffer 450 μ l를 혼합합니다.
- (3) 0.1mM Glucose standard solution이 준비됩니다. 이를 96well plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l를 분주한 후 Assay buffer로 volume을 50 μ l로 조정합니다.
- (4) 각 plate에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 nmol/well의 standard set가 만들어집니다.

Standard No.	Volume of 0.1mM Glucose Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Glucose Conc. (nmol/well)
1	0 μ l	50 μ l	50 μ l	0
2	2 μ l	48 μ l	50 μ l	0.2
3	4 μ l	46 μ l	50 μ l	0.4
4	6 μ l	44 μ l	50 μ l	0.6
5	8 μ l	42 μ l	50 μ l	0.8
6	10 μ l	40 μ l	50 μ l	1.0

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것이 좋습니다.

3. Reaction mixture preparation

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

1) Colorimetric method:

Components	Reaction mixture	Background mixture
Glucose Assay buffer	46 μ l	48 μ l
Glucose Enzyme mix	2 μ l	-
Glucose Probe	2 μ l	2 μ l
ToTal	50 μ l	50 μ l

2) Fluorometric method:

Components	Reaction mixture	Background mixture
Glucose Assay buffer	47.6 $\mu\ell$	49.6 $\mu\ell$
Glucose Enzyme mix	2 $\mu\ell$	-
Glucose Probe	0.4 $\mu\ell$	0.4 $\mu\ell$
ToTal	50 $\mu\ell$	50 $\mu\ell$

4. Reaction mixture를 Glucose standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50 $\mu\ell$ 씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

* Sample background control 을 준비한 경우 background mixture 50 $\mu\ell$ 를 넣어줍니다.

5. Plate를 빛이 차단된 37°C에서 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. Glucose standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.

(Glucose standard Vs OD_{570nm})

4. Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 sample내의 Glucose 양을 계산하여 줍니다.

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

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

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

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

V: well에 분주한 시료의 양 (μ l)

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

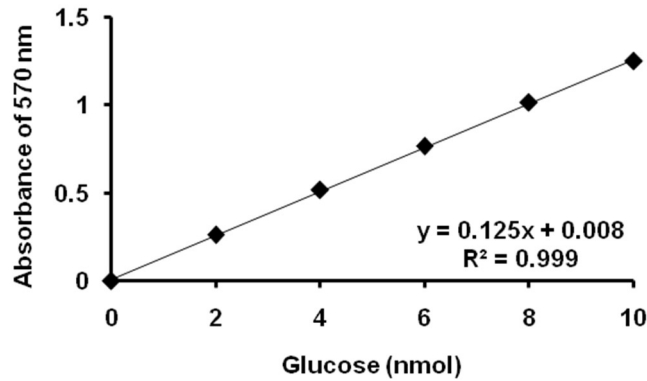


Fig. Glucose standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

- Spike sample: 샘플내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들어 Glucose 가 실제로는 2ng이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 1.6ng (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다.
이러한 현상을 보정하기 위해 샘플과 별도로 샘플에 일정량의 Glucose (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 Glucose 의 양(B) = OD1 / (OD2 – OD3) x Glucose spike (nmol)

OD1: Sample 의 OD값 (blank corrected)

OD2: Spiked sample의 OD값 (blank corrected)

OD3: Sample의 OD값 (blank corrected)

Glucose spike: 샘플에 넣은 Glucose spike의 양

