

EZ- Free Fatty Acid Assay Kit

Metabolism Assay Kit
(Colorimetric/Fluorometric)

Cat No. DG-FFA100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Fatty Acid (지방산)은 정상적인 신진대사와 많은 질병에서 매우 중요한 역할을 합니다. 그들은 prostaglandins, leucotrienes 등과 같은 많은 생체 활성 부류의 화합물의 전구체이며 자폐증, 면역계 및 염증 반응과 같은 다양한 기능에 연관되어 있습니다.

EZ-Free Fatty Acid Assay Kit는 편리하고 감도가 높은 효소기반 방법을 사용하여 혈청, 혈장 및 기타 체액, 식품, 성장 배지 등과 같은 다양한 생물학적 시료에서 지방산을 검출할 수 있는 제품입니다. 시료내에 존재하는 지방산이 CoA 유도체로 전환되고 이어서 산화되면서 Probe에 발색을 유도하는 중간물질(H_2O_2)를 생성하는 원리를 이용하였으며 흡광(OD 570 nm) 및 형광(Ex/Em = 535/595 nm)으로 쉽게 측정할 수 있습니다.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage
Fatty Acid Assay Buffer	25 ml	-	-20°C
Fatty Acid Enzyme Mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20°C
Fatty Acid ACS Reagent (Lyophilized)	1 vial	Blue	-20°C
Fatty Acid Enhancer	200 μ l	Purple	-20°C
Fatty Acid Probe	200 μ l	Yellow	-20°C
Fatty Acid Standard (1 mM)	300 μ l	Green	-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 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
Fatty Acid Enzyme Mix Fatty Acid ACS Reagent	220 μl Assay Buffer을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	용해한 용액은 -20°C 에 보관하되 1개월 이내에 사용하십시오.
Fatty Acid Enhancer Fatty Acid Probe	사용시에는 실온에서 충분히 녹인 후 사용하기 바랍니다.	사용하시고 남은 용액은 -20°C 에 보관하되 2개월 이내에 사용하십시오.
Fatty Acid Standard	사용 전 실온에서 충분히 녹인 후, 80°C water bath 또는 heat block에서 1분동안 incubation 후 30초 동안 vortexing 합니다. 2번 정도 더 반복 후 실온까지 충분히 cool down 후에 사용합니다. (<u>vial cap이 잘 닫혀 있는지 반드시 확인 / Cool down 후 Standard 용액이 투명해지는 것을 확인</u>)	사용하시고 남은 용액은 -20°C 에 보관하되 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 $2-50 \mu\text{l}$ 넣은 후, 최종 volume은 Assay buffer로 $50 \mu\text{l}$ 가 되도록 조정합니다. ($n \geq 2$)

1) Liquid Samples (plasma, serum, urine and other biological fluids)

: 바로 분석에 사용하셔도 됩니다.

2) Cell or Tissue

① 1×10^6 cells 또는 10 mg tissue sample을 준비합니다.

② PBS를 이용하여 Cell 또는 tissue sample을 washing 해줍니다.

- ③ Cell 또는 tissue sample에 chloroform-Triton X-100 (1 % Triton X-100 in pure chloroform) 200 μl 를 넣고 얼음에서 균질화 (homogenization) 합니다.
 - ④ Microcentrifuge에 넣고 최대속도로 5-10분 동안 원심분리 합니다.
 - ⑤ Organic phase (lower phase)를 회수하여 50 °C에서 건조하여 chloroform을 제거한 후 다시 진공 건조기에서 30분간 잔여 chloroform을 완전히 제거합니다.
 - ⑥ 건조시킨 lipids에 free fatty acid assay buffer 200 μl 를 넣고 5분간 vortexing 합니다.
 - * 용액이 탁하거나 유백색 일 수 있으나 분석에 영향을 주지 않습니다.
 - * 더 많은 양의 sample을 테스트할 경우는 각 단계에서의 시약을 샘플 양에 맞게 비례적으로 증가시키면 됩니다.
- 3) 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정 값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.
- 4) 시료의 측정 값이 높은 background 값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 시료를 background control로 준비합니다.

2. Standard preparation

1) Colorimetric method

96 well plate에 1 mM Fatty Acid Standard를 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 씩 분주하고 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 Fatty Acid Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Fatty Acid 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 Fatty Acid standard solution 10 μl 와 assay buffer 90 μl 를 혼합하여 0.1 mM Fatty Acid 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 Fatty Acid Standard	Volume of Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard Fatty Acid 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. Fatty Acid ACS Reagent

각 standard와 sample well에 ACS Reagent를 각 2 μl 씩 넣어주고 빛을 차단하여 37 °C에서 30분간 반응시켜줍니다.

4. Reaction mixture preparation

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

1) Colorimetric method

Components	Reaction Mixture
Fatty Acid Assay Buffer	44 μl
Fatty Acid Enzyme Mix	2 μl
Fatty Acid Enhancer	2 μl
Fatty Acid Probe	2 μl
Total	50 μl

2) Fluorometric method

Components	Reaction mixture
Fatty Acid Assay buffer	45.6 $\mu\ell$
Fatty Acid Enzyme mix	2 $\mu\ell$
Enhancer	2 $\mu\ell$
Fatty Acid Probe	0.4 $\mu\ell$
Total	50 $\mu\ell$

5. Fatty Acid standard와 sample을 넣은 각 well에 reaction mixture를 50 $\mu\ell$ 씩 넣어준 후 잘 섞어줍니다. (Multi-pipette 이용을 권장합니다.)

6. 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

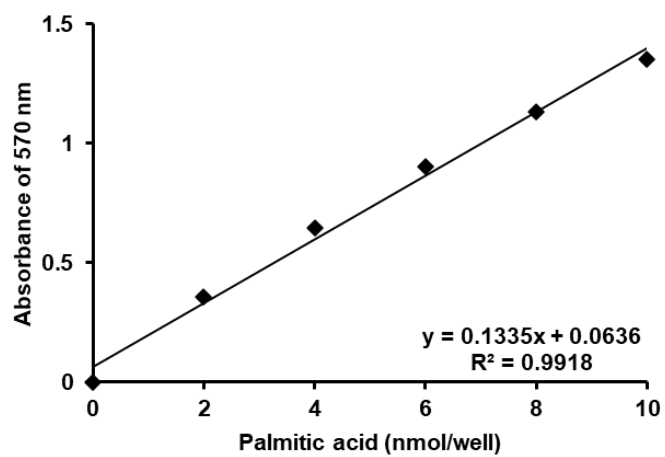
- 모든 측정값에서 standard 1 값(background)을 빼줍니다.
- 각 standard well과 sample well의 duplicate 측정값을 평균합니다.
- Fatty Acid standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.
- Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 sample내의 Fatty Acid 양을 계산하여 줍니다.
- 4에서 계산된 sample 내의 Fatty Acid 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Fatty acid의 농도를 농도를 계산하여 줍니다.

$$\text{샘플 내 Fatty acid 농도 (C)} = B/V \times D \text{ (nmol}/\mu\ell \text{ or mM)}$$

B : Standard curve로부터 구한 측정 well의 fatty acid의 양(nmol)

V : well에 분주한 시료의 양 ($\mu\ell$)

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



Fatty acid 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