

EZ- Ascorbic Acid Assay Kit

Metabolism assay kit
(Colorimetric)

Cat. No. DG-ASC100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Ascorbic Acid (비타민C)는 많은 생물학적 과정에서 중요한 역할을 담당합니다. 이는 강력한 항산화제, 항염증제, 항바이러스제 및 면역 자극제로서 다양한 생물학적 물질에 존재합니다. 혈정과 같은 생물학적 시료에 다양한 항산화제가 존재하며, 대부분 Ascorbic Acid 분석에 강한 반응을 보입니다.

EZ-Ascorbic Acid (FRASC) Assay Kit는 혈청, 기타 체액, 조직 및 세포 추출물, 배지 및 식품 등 생물학적 샘플에서 아스코르브산을 빠르고 간단하며 민감하게 측정할 수 있는 방법을 제공합니다. 이 분석에서 Fe^{3+} 는 항산화제에 의해 Fe^{2+} 로 환원되며, 색 측정 탐침과 킬레이트를 형성하여 545~600 nm 범위에서 강한 발색을 일으키는 부산물이 생성됩니다.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage
Ascorbic Acid Assay buffer	25 mL	-	
Ascorbic Acid Enzyme	2 vials	Red	
Catalyst	1 mL	Blue	-20°C
Ascorbic Acid Probe	1 mL	Yellow	
Ascorbic Acid Standard (10mM)	1 vial	Green	

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

▪ Preparation of Reagent

Component	Preparation	Storage and Stability
Ascorbic Acid Buffer	사용하기 전 실온에서 충분히 보관하여 사용합니다.	사용 후 4°C 또는 -20°C에 보관하여 사용합니다.
Ascorbic Acid Enzyme	D.W 250 μ l 넣어 부드럽게 inverting 하며 잘 섞어줍니다.	사용 후 -20°C에서 보관하고, 2개월 안으로 사용하십시오.
Ascorbic Acid Standard (10 mM)	D.W 1 ml 넣어 부드럽게 inverting 하며 잘 섞어줍니다.	사용 후 -20°C에서 보관하고, 2개월 안으로 사용하십시오.

* 본 protocol은 96-well plate를 이용하여 실험/측정하도록 최적화 되어있습니다.

* Buffer가 차가운 상태로 assay 시 반응이 잘 일어나지 않을 수 있습니다. 충분히 실온에 보관하십시오.

* Enzyme과 Ascorbic acid Standard가 완전히 녹았는지 확인 후 사용하십시오.

▪ General Protocol

Sample preparation

Note

- Sample이 100 μ l 보다 적을 경우 D.W로 volume을 맞추어 줍니다.
- 흡광도 측정 시 O.D값이 0 ~ 2.5 이내에 있는지 확인하기 위해 여러 농도의 sample을 준비하십시오
- 용혈된 serum 및 plasma 사용 시 결과에 영향을 줄 수 있습니다.
- Heparin 처리된 plasma는 EDTA plasma보다 더 안정하기 때문에 heparin 처리된 plasma를 권장합니다.

1. Serum

- ① 항응고제가 없는 tube 에서 혈액을 채취합니다.
- ② 실온에서 30 분 동안 혈액이 응고시킨 후 2500 x g에서 20 분 동안 centrifuge 합니다.
- ③ 상층액을 제거하고, sample 은 바로 사용하거나 -80°C에서 냉동하여 보관합니다.

2. Plasma

- ① Sample 을 수집하고 항응고제로서 Heparin 이 포함된 tube 에 sample 을 섞어줍니다.
- ② 4°C에서 10 ~ 15 분 동안 3,000 rpm 으로 centrifuge 합니다.
- ③ 상층액을 제거하고, sample 은 바로 사용하거나 -80°C에서 냉동하여 보관합니다.

3. Cells and tissues

- ① Cell 과 tissues 에 D.W 를 첨가하여 얼음 위에서 초음파 분쇄 또는 균질화합니다.
- ② 4°C에서 15 분 동안 3,000 rpm 으로 centrifuge 하고, 상층액을 사용합니다
- ③ 보다 정확한 측정을 위해 Ascorbic Acid Assay Buffer 를 사용하여 여러 농도의 sample 을 준비하십시오.

Ascorbic Acid Standard preparation

: 10 mM Ascorbic Acid Solution 100 μl 와 distilled water 900 μl 를 혼합하여 1 mM Ascorbic Acid Solution을 제조합니다.

1 mM Ascorbic Acid Solution 0, 10, 20, 30, 40, 50 μl 에 D.W를 첨가하여 Final volume을 500 μl 로 조정합니다.

Standard No.	1 mM Ascorbic Acid Solution	D.W	Final standard volume in	Final Ascorbic Acid Conc. (nmol/well)
1	0 μl	500 μl	500 μl	0
2	10 μl	490 μl	500 μl	2
3	20 μl	480 μl	500 μl	4
4	30 μl	470 μl	500 μl	6
5	40 μl	460 μl	500 μl	8
6	50 μl	450 μl	500 μl	10

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

* Standard와 sample은 농도별로 최소 4 well을 준비합니다. 2 well은 enzyme 없이, 나머지 2well은 enzyme 을 처리하여 blank로 사용됩니다.

Reaction mixture preparation

: 1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay양을 계산하여 assay양+1만큼 reaction mix를 준비합니다.

Components	Reaction mixture
Ascorbic Acid Buffer	80 μl
Ascorbic Acid Probe	10 μl
Catalyst	10 μl
Total	100 μl

Ascorbic Acid (FRASC) Assay

	Ascorbic Acid	Ascorbic Acid Blank	Sample	Sample Blank
Ascorbic Acid standard solution	100 μl	100 μl	-	-
Sample	-	-	100 μl	100 μl
Ascorbic Acid enzyme	-	10 μl	-	10 μl
D.W	10 μl	-	10 μl	-
<u>실온에서 15분 동안 반응</u>				
Reaction mixture	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Reaction mixture 분주 후 2~3분 내로 593 nm에서 측정				

* Blank는 enzyme에 의해 선택적으로 Ascorbic acid만을 제거하여 흡광도를 측정합니다.

- ① 실험 전 Buffer, Catalyst 및 Probe를 실온 보관하여 충분히 녹인 후 사용합니다.
- ② 96 well plate에 standard 및 sample을 농도별로 100 μl 씩 최소 4 well씩 준비합니다.
- ③ 농도별로 2 well에는 D.W 10 μl 를 넣고, 2 well은 blank로 Ascorbic Acid Enzyme 10 μl 를 넣어 plate shaker로 약 30초 동안 잘 섞어줍니다.
* 잘 섞이지 않았을 경우 정확한 측정이 안될 수 있으므로 plate shaker가 없을 시 피펫으로 고르게 섞어줍니다.
- ④ 실온에서 15분 동안 반응시켜줍니다.
- ⑤ 미리 준비해 둔 reaction mix를 모든 well에 100 μl 씩 넣은 후 2~3분 내로 593 nm에서 흡광도를 측정합니다.

▪ Calculation

1. 모든 측정값에서 background의 O.D 값을 보정해줍니다.
* Background = O.D_{593nm} from Ascorbic Acid standard No.1 (0 μM Ascorbic Acid)
2. 각 standard well과 sample well의 duplicate 측정값의 평균을 구합니다.
3. 각 농도별 Ascorbic Acid 및 sample 평균값에서 blank 평균값을 빼 보정해줍니다.
4. Ascorbic Acid standard O.D 값을 이용하여 standard curve를 그려줍니다.
5. Standard curve에 sample O.D 측정값 수치를 대입하여 sample내의 Ascorbic Acid 양을 계산하여 줍니다.
6. 5에서 계산된 Ascorbic Acid 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 sample 내의 Ascorbic Acid의 농도를 계산하여 줍니다.

샘플 내 Ascorbic Acid 농도 (C) = B/V x D (nmol/μℓ or μmol/ml or mM)

B: Standard curve로부터 구한 측정 well의 Ascorbic Acid의 양 (nmol)

V: well에 분주한 시료의 양 (즉, 100 μℓ)

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

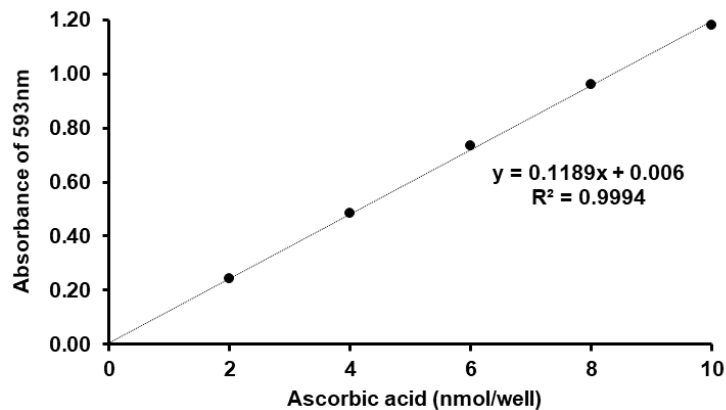


Fig. Ascorbic acid standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ 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 (GPx) Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Fluorometric/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