

Nitric oxide assay (KGE001)

※ 본 프로토콜은 고객의 이해를 돕기 위해 제작된 참고용이며 웅비 메디텍에서는 결과에 대한 책임지지 않습니다. 각 실험에 맞게 프로토콜과 참고문헌을 반드시 참조하시기 바랍니다.

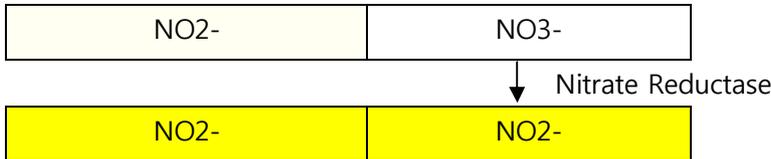
1.특징

1. 이 제품은 protein을 이용하여 정량을 하는 ELISA 방법이 아닙니다.
2. Griess reagent라는 chemical을 이용하여 NO₂-를 측정하는 원리입니다.
3. sample 내에 존재하는 산화질소 NO₂-/NO₃-/total NO를 측정가능합니다.
4. 2 step으로 실험이 이루어 집니다.

(1step) sample 내에 존재하는 NO₂-를 측정합니다.



(2step) 동일한 sample에 nitrate reductase 처리하여 NO₃-를 NO₂- 형태로 전환합니다.



Total NO₂-(step2)에서 endogenous NO₂-(step2)를 빼면 NO₃- 값을 얻을 수 있음

2.Sample 전처리

전 처리가 필요한 이유

- Griess reagent는 많은 요인들에 의해 interference 발생
- 효소 작용에서 inhibitor 존재하거나 nitrate 전환 실패 가능성
- cell sup: media에 존재하는 nitrate salt
- in vivo : 식이로 섭취하는 nitrate
- 이러한 영향을 줄이기 위해 protein 제거가 필요
- 10000MW ultra filtration 필요

전 처리 방법

사용 filter: Millipore Amicon Ultra-0.5 10K(#UFC5010)

- ① filter 사용 전 washing
기포가 들어가지 않도록 하여 증류수에 8시간 담귀 둡니다.
- ② 사용 하기 전 원심 분리하여 물기를 제거 합니다. (1000rpm /3min/20°C)
- ③ filter unit 내부의 물방울을 제거한 후 sample 300ul를 loading 합니다.
※washing 후 sample loading까지 filter 가 마르지 않도록 주의
- ④ 10000rpm/30~50min/20°C 원심 분리를 하여 약 150~200 ul의 sup.을 얻습니다.
- ⑤ 이 sup을 sample 종류에 따라 희석하여 assay를 합니다.