

Affi-Max™ Bradykinin Assay Kit

(Colorimetric)

BE-BRA-048, 48 tests

제품 원리

Affi-Max™ Bradykinin Assay Kit는 Anti-rabbit IgG Antibody가 코팅된 Microstrip well에 Bradykinin과 Peroxidase labeling된 Bradykinin이 경쟁적으로 반응하는 원리를 이용하여 샘플 내에 존재하는 Bradykinin을 정량하는 Kit입니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Anti-rabbit IgG Precoated 8 Wells Strip	6 strips	-20°C
Peroxidase Conjugated Bradykinin	1 ml	
Bradykinin Standard (100 µg/ml)	10 µl	
Anti-bradykinin Rabbit Antibody (Lyophilized)	1 vial	
Assay Buffer A	15 ml	
Assay Buffer B	15 ml	
Deproteinizing Reagent	15 ml	
OPD (Lyophilized)	1 vial	
Substrate Diluent Buffer	10 ml	
10X PBS	30 ml	
Stop Solution	10 ml	

* 개봉하지 않은 제품은 -20°C ~ -80°C에서 보관 시 6개월까지 사용 가능합니다.

* 냉동 및 해동을 반복하지 않습니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Microplate reader (492 nm Filter)
- ▶ Reservoir
- ▶ Absorbent paper
- ▶ Vortexer
- ▶ D.W.
- ▶ Microtube
- ▶ Shaker
- ▶ Aluminum foil
- ▶ Micro centrifuge

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- 모든 Buffer와 Solution은 사용 전 상온에 충분히 보관합니다.
- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

Anti-rabbit IgG Precoated 8 wells Strip

사용할 만큼만 꺼내고 남은 Strip은 밀봉하여 -20°C에 보관합니다.

Assay Buffer A/B, Substrate Diluent Buffer

상온에서 충분히 녹인 후 잘 섞어서 사용합니다. 녹인 후에는 4°C에 보관합니다.

10X PBS

Distilled water 270 ml에 10X PBS 30 ml을 넣고 잘 섞어 1X PBS를 만듭니다.

Anti-bradykinin Rabbit Antibody

Lyophilized된 Antibody에 1X PBS를 50 µl 첨가하여 100X Bradykinin antibody stock을 만듭니다. 실험 직전에 100X Bradykinin antibody stock을 1X PBS에 100배 희석하여 사용합니다.

ex) 100X Bradykinin antibody stock : 1X PBS = 50 µl : 4,950 µl

* 100X Bradykinin antibody stock은 4°C에서 1개월 간 안정합니다.

* 1X Bradykinin antibody는 사용 후 폐기합니다.

Peroxidase Conjugated Bradykinin

실험 직전에 Assay Buffer A에 5배 희석시켜 사용합니다. 희석 후 남은 용액은 폐기합니다.

ex) Peroxidase Conjugated Bradykinin : Assay Buffer A = 500 µl : 2,000 µl

Assay Buffer C

Deproteinizing Reagent : D.W. : Assay Buffer B = 1 : 5 : 6의 비율로 희석시켜 Assay Buffer C를 만듭니다.

ex) Deproteinizing Reagent : D.W. : Assay Buffer B = 1 ml : 5 ml : 6 ml

OPD

사용 직전에 Substrate Diluent Buffer를 1 ml 첨가하고 vortexing하여 충분히 녹인 후, 6.5 ml의 Substrate Diluent Buffer에 전부 옮겨줍니다. 사용 후에는 폐기합니다. (1 Vial을 7.5 ml의 Substrate Diluent Buffer에 전부 희석시킵니다.)

Sample type

- Urine, Blood

Sample preparation

Urine

- ① 500 μ l의 Urine와 100 μ l의 Deproteinizing Reagent를 Microtube에 담고 잘 섞은 뒤 4°C에서 1,000 ~ 1,500 x g으로 10 min 간 원심분리 합니다.
- ② 250 μ l의 상등액과 250 μ l의 Assay Buffer B를 섞은 후 샘플로 사용합니다.

Blood

- ① 항응고제가 없는 플라스틱 Syringe를 사용하여 주정중피정맥 또는 상완동맥에서 혈액을 채취하여 10 sec 이내에 바늘을 제거한 후 20 ml의 냉각된 Absolute ethanol (HPLC Grade)에 첨가하여 1 min 간 잘 섞어줍니다.
- ② 4°C에서 30 min 간 1,500 x g로 원심분리한 후 상등액을 5 ml의 80% Ethanol과 섞어준 뒤, 다시 원심분리 합니다.
- ③ 회수한 상등액을 감압하여 증발시킨 후, 1 ml의 D.W.를 첨가해 잔여물을 용해합니다.
- ④ 0.1 N HCl을 사용하여 pH 2~3으로 맞춘 후 3 ml의 Diethyl ether로 2번 wash하여 검액 속의 지질을 제거합니다. 감압하여 Diethyl ether를 제거하고 액체를 모두 증발시킵니다.
- ⑤ Assay Buffer C를 적당량 첨가하여 잔여물을 용해시킨 후, 4°C에서 30 min 간 10,000 x g로 원심분리 합니다. 상층액을 샘플로 사용합니다.

Standard preparation

- ① Assay Buffer A 495 μ l에 Bradykinin Standard 5 μ l를 첨가하여 1,000 ng/ml 농도의 Bradykinin stock을 만들어줍니다.
- ② Bradykinin (1,000 ng/ml)을 Assay Buffer A에 100 ng, 25 ng, 6.25 ng, 1.56 ng, 0.39 ng, 0.098 ng 및 0 ng이 함유되도록 4배씩 Serial dilution 하여 표준 농도 7 구간을 만듭니다. (사용 직전까지 얼음에 꽂아둡니다.) 각 Well에 Standard 를 50 μ l씩 첨가하면 각 Well의 최종 농도는 5,000 pg/well, 1,250 pg/well, 312.5 pg/well, 78.1 pg/well, 19.5 pg/well, 4.9 pg/well, 0 pg/well이 됩니다.

실험 과정

- ① 위에서 준비한 100X Bradykinin antibody stock을 1X PBS에 100배 희석 후, 각 시험적용 Well에 100 μ l을 첨가합니다. 접착필름으로 Well을 Sealing하여 실온에서 1 h 동안 Shaking incubation 합니다.
- ② 각 Well을 1X PBS 200 μ l로 4번 Wash합니다.
- ③ 위의 Standard preparation을 참고하여 Bradykinin standard를 만듭니다. 각 Well에 다음과 같은 용량으로 처리합니다. 접착필름으로 Well을 Sealing하여 실온에서 1 h 동안 Shaking incubation 합니다.

	Blank well	Standard Curve each well	Sample Test each well
Assay Buffer A	50 μ l		50 μ l
Bradykinin standard		50 μ l	
Sample			100 μ l
Assay Buffer C	100 μ l	100 μ l	

- ④ Assay Buffer A에 5배 희석한 Peroxidase Conjugated Bradykinin을 Blank well을 제외한 시험적용 Well에 50 μ l 첨가한 후 4°C에서 Overnight shaking incubation 합니다. Blank well에는 Assay Buffer A를 50 μ l 첨가합니다.
- ⑤ 각 Well을 1X PBS 200 μ l로 4번 Wash 합니다.
- ⑥ Substrate Diluent Buffer 7.5 ml에 녹인 OPD를 100 μ l씩 시험적용 Well에 첨가합니다. 접착필름으로 Well을 덮고 차광하여 실온에서 30 min 간 Shaking incubation 합니다.
- ⑦ Stop Solution 100 μ l를 각 시험적용 Well에 첨가하고 Microplate reader로 492 nm에서 흡광도 값을 측정합니다.

결과 분석

- Bradykinin standard의 함유량과 흡광도 값으로 Standard curve를 작성합니다.

Bradykinin 정량 시험 결과

정상인의 Urine sample을 이용하여 Bradykinin 정량 시험을 수행한 결과, Standard curve는 그림 1. 과 같습니다.

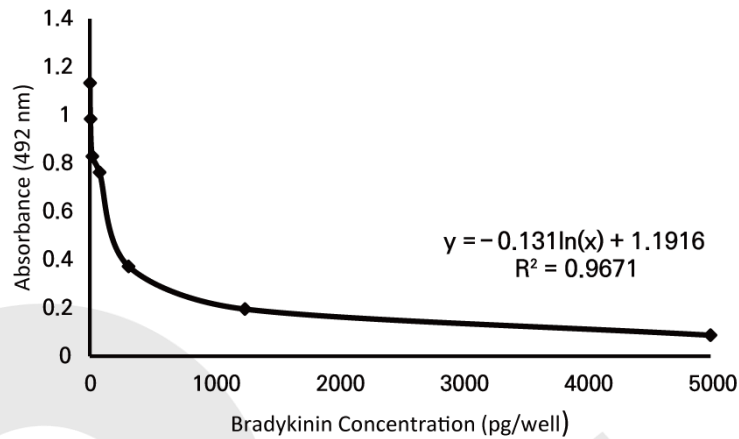


그림 1. Bradykinin standard curve

Urine sample 원액은 Absorbance 492 nm에서 0.81이 나왔으며, 위 식에 대입하여 농도 환산 시 181.7 pg/ml의 값을 얻었습니다.

Related products

- | | |
|---------------|---|
| - BM-AOA-F100 | PicoSens™ ACE1 Activity Assay Kit (Fluorometric) |
| - BM-AOS-F100 | PicoSens™ ACE1 Inhibitor Screening Kit (Fluorometric) |
| - BM-ATA-F100 | PicoSens™ ACE2 Activity Assay Kit (Fluorometric) |
| - BM-ATS-F100 | PicoSens™ ACE2 Inhibitor Screening Kit (Fluorometric) |

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note