

OxiTec™ Hydrogen Peroxide / Peroxidase Assay Kit

(Colorimetric/ Fluorometric)

BO-PER-500, 100 Assays

제품 원리

H₂O₂ + Peroxide Assay

Deproteinized sample + Oxi Probe $\xrightarrow{\text{HRP}}$ Resorufin

Peroxidase Assay

Sample + Oxi Probe + H₂O₂ $\longrightarrow$ Resorufin

BIOMAX사의 OxiTec™ Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit는 Oxi-Probe와 Horseradish Peroxidase(HRP)를 이용하여 Sample 내에 존재하는 H₂O₂ 혹은 Peroxidase의 활성을 분석하는 제품입니다. HRP가 있는 상태에서 Oxi-Probe는 샘플 내 H₂O₂와 반응하여 Resorufin을 형성하며, H₂O₂가 있는 상태에서 Oxi-Probe는 샘플 내 Peroxidase와 반응하여 Resorufin을 형성합니다. 형성된 Resorufin은 흡광도 560 nm와 형광 Ex/Em= 540/590 nm에서 측정 가능합니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Oxi-Probe	200 µl x 3 vials	-20°C
Horseradish Peroxidase (HRP, 10 U)	1 vial	
Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂ , 3%, MW=34))	200 µl	
5X Reaction Buffer (pH 7.4, 0.25 M)	28 ml	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 약 6개월간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Microtube
- ▶ Sonicator
- ▶ Colorimetric microplate reader (560 nm Filter)
- ▶ Fluorescence microplate reader (Excitation : 530~560 nm, Emission : 580~590, Filter, 37°C)
- ▶ Micro centrifuge (4°C)

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

Oxi-Probe

실온에서 충분히 녹여 사용하시고 사용 직전 혼합하여 사용합니다. 사용 후 남은 용액은 빛을 차단한 상태에서 -20 °C에 보관합니다.

1X Reaction Buffer

5X Reaction Buffer 4 ml과 D.W. 16 ml을 혼합하여 준비합니다.

10 U/ml Horseradish Peroxidase (HRP)

Horseradish Peroxidase (HRP, 10 U) vial에 1X Reaction Buffer 1 ml를 혼합하여 준비합니다.

소량 Aliquot하여 -20 °C에 보관합니다.

20 mM Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

Hydrogen Peroxide (H₂O₂, 3%) 23 µl와 D.W. 977 µl를 혼합하여 준비합니다. 혼합된 용액은 안정성이 매우 낮아 실험 시 필요량만 섞어 사용하시기 바랍니다.

주의 사항

- ▶ Oxi-Probe 반응에 의해 생성되는 반응물인 Resorufin은 Dithiothreitol (DTT), 2-Mercaptoethanol과 같은 Thiol계 물질에 불안정합니다. 실험 진행 시 Sample에 함유된 DTT와 2-Mercaptoethanol의 최종 농도는 10 µM 보다 높지 않아야 합니다.
- ▶ 실험진행 시 pH에 유의합니다. (적정 pH=7~8)
반응 최종산물인 Resorufin의 흡광 혹은 형광 측정값은 pH에 의해 변화됩니다. pKa=6.0 미만에서는 Resorufin의 흡광 또는 형광 파장이 달라지며 감도가 현저하게 떨어집니다. 또한 Oxi-Probe는 pH 8.5 이상에서는 불안정하여 정확한 측정이 어렵습니다. 따라서, 실험 진행 시 pH 7~8에서 진행해야 함을 유의하여 주시고, OxiTec™ Hydrogen Peroxide / Peroxidase Assay Kit 에 포함되어 있는 완충액(Reaction Buffer, pH 7.4)을 사용하여 주시기 바랍니다.
- ▶ Sample에 포함된 H₂O₂ 또는 HRP 농도가 너무 높은 경우 반응의 최종 산물인 Resorufin을 산화시켜 정확한 측정이 어렵습니다. 예비 실험을 통해 측정하고자 하는 샘플을 Serial dilution 하여 Sample의 대략적인 양을 결정합니다. (Sample 희석 시 1X Reaction Buffer를 이용합니다.)

Sample preparation

- * 모든 Sample은 Fresh한 상태이어야 하며, -80°C에서 보관 하더라도 1~2 개월 이상 된 Sample을 측정할 시 결과값이 떨어질 수 있습니다.
- * 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행한 후 사용을 권장합니다.

Cell culture supernatant

Particles를 제거한 후, 10,000 rpm에서 5 min 간 Centrifuge 하여 상층액만 사용합니다. 또한, pH 7~8로 맞추어 사용하셔야 합니다. Serum sample의 경우 Interfere 현상이 있을 수 있으므로 추천하지 않습니다.

Cell lysate

1~2 X 10⁶ cells/ml 나, 50 mg/ml 의 조직 샘플을 1X Assay Buffer나 PBS에 넣은 후 Ice 위에서 Homogenize나 Sonicate를 진행합니다. 그 후 Debris를 제거한 후 사용합니다.

Plasma or Urine

Particles를 제거한 후 10,000 rpm에서 5 min간 Centrifuge합니다. Supernatant를 Direct로 사용하거나 1X Assay Buffer 또는 PBS에 희석하여 사용합니다.



Hydrogen Peroxide (H₂O₂) assay

- Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.
- 정확한 측정을 위해 Standard 및 Sample은 각각 Duplicate 이상으로 준비하여 실험하시는 것이 좋습니다.

H₂O₂ standard preparation (Colorimetric assay)

- ① 20 mM H₂O₂ 50 μ l 와 D.W. 950 μ l를 혼합하여 1 mM H₂O₂ (#6)를 만듭니다.
- ② 만들어진 1 mM H₂O₂ (#6)와 1X Reaction Buffer를 아래 표와 같이 혼합하여 각각의 H₂O₂ Standard solution을 제작합니다.

H₂O₂ standard preparation (Fluorometric assay)

- ① 20 mM H₂O₂ 5 μ l와 D.W. 955 μ l를 혼합하여 100 μ M H₂O₂ (#6)를 만듭니다.
- ② 만들어진 1 mM H₂O₂ (#6)와 1X Reaction Buffer를 아래 표와 같이 혼합하여 각각의 H₂O₂ Standard solution을 제작합니다.

Number	STD Stock	Vol. of STD Stock (μ l)	1X Reaction Buffer	Final Vol. Standard in well (μ l)	Final H ₂ O ₂ Concentration (μ M)	
					Colorimetric	Fluorometric
#5	①#6	50	450	50	50	5
#4	#5	250	250		25	2.5
#3	#4	250	250		12.5	1.25
#2	#3	250	250		6.25	0.625
#1	#2	250	250		3.125	0.3125
#0		0	0		0	0

Standard curve를 사용하지 않을 경우 : Positive/Negative control을 준비합니다.

► Positive control

- Colorimetric assay : 100 μ M H₂O₂ Solution (#5) - 50 μ l
- Fluorometric assay : 10 μ M H₂O₂ Solution (#5) - 50 μ l

► Negative control

- 1X Reaction Buffer (without H₂O₂) - 50 μ l

실험 과정

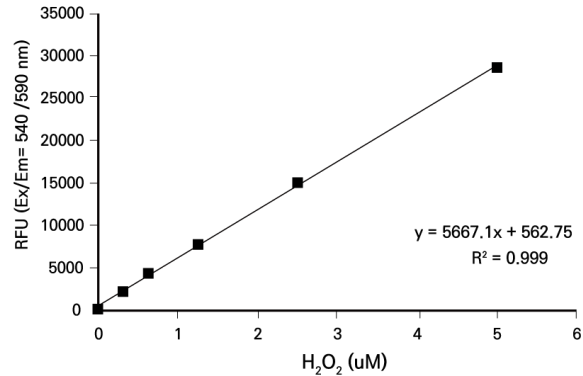
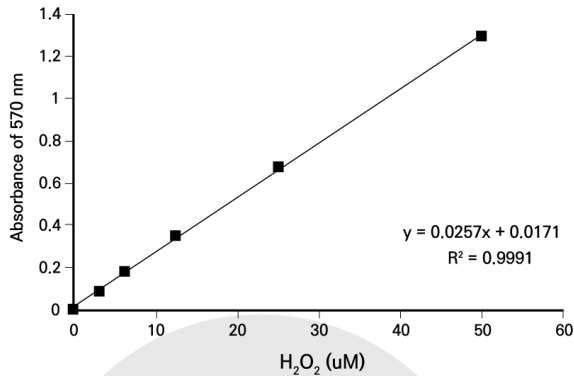
- ① 96-well Microplate에 준비된 H_2O_2 Standard solution을 각각 50 μ l /well 씩 넣어 줍니다.
- ② 준비 된 Sample을 96-well Microplate 에 50 μ l/well씩 넣어 줍니다.
- ③ Oxi-Probe/HRP Working solution을 아래 표와 같이 만들어 Sample과 Standard well에 50 μ l/well 씩 넣어 줍니다.

Components	Total volume (100 assays)
Oxi-Probe	100 μ l
10 U/ml Horseradish-Peroxidase (HRP)	200 μ l
1X Reaction Buffer	4.70 ml

- ④ Plate를 빛이 차단된 실온에서 30 min 간 반응시킵니다.
- ⑤ Microplate reader 를 사용하여 반응 값을 측정합니다.
Fluorescence plate reader를 사용할 경우 – Excitation : 530~570 nm
Emission : 580~590 nm (Optimal Ex/Em = 540/590)
Absorbance plate reader를 사용할 경우 – 570 nm

결과 분석

- Standard curve를 사용할 경우 : 각 well의 측정값에서 Standard #0 값을 빼고 정리합니다.
- Horseradish Peroxidase (HRP) 1 U = Pyrogallol로부터 20 sec 간 1 mg의 Purpurogallin 생성을 촉매하는 효소의 양을 말합니다. (at 20°C and pH 6.0)



Hydrogen peroxide(H₂O₂) Standard curve.

(Left – used the Absorbance plate reader, Right – used the Fluorescence plate reader)

Standard curve를 사용하지 않을 경우 : 다음과 같이 정리합니다.

Colorimetric assay

$$H_2O_2(\mu M) = \frac{A - B}{C - B} \times 50 \mu M$$

A : 각 Well 당 측정값

B : Negative control의 측정값

C : Positive control의 측정값

Fluorometric assay

$$H_2O_2(\mu M) = \frac{A - B}{C - B} \times 5 \mu M$$

A : 각 Well 당 측정값

B : Negative control의 측정값

C : Positive control의 측정값

Peroxidase assay

- Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.
- 정확한 측정을 위해 Standard 및 Sample은 각각 Two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것이 좋습니다.

Peroxidase standard preparation (Colorimetric assay)

- ① 10 U/ml Horseradish Peroxidase 20 μ l 와 D.W. 980 μ l를 혼합하여 200 mU/ml Peroxidase를 만듭니다.
- ② 만들어진 200 mU/ml Peroxidase (#6) 와 1X Reaction Buffer 를 아래 표와 같이 혼합하여 각각의 Peroxidase Standard solution을 제작합니다.

Peroxidase standard preparation (Fluorometric assay)

- ① 10 U/ml Horseradish Peroxidase 10 μ l와 D.W. 990 μ l를 혼합하여 100 mU/ml Peroxidase를 만듭니다.
- ② 만들어진 100 mU/ml Peroxidase 100 μ l와 D.W. 400 μ l를 혼합하여 20 mU/ml Peroxidase를 만듭니다.
- ③ 만들어진 20 mU/ml Peroxidase (#6)와 1X Reaction Buffer를 아래 표와 같이 혼합하여 각각의 Peroxidase Standard solution을 제작합니다.

Number	STD Stock	Vol. of STD Stock (μ l)	1X Reaction Buffer	Final Vol. Standard in well (μ l)	Final Peroxidase Concentration (μ M)	
					Colorimetric	Fluorometric
#5	①#6	50	450	50	10	1
#4	#5	250	250		5	0.5
#3	#4	250	250		2.5	0.25
#2	#3	250	250		1.25	0.125
#1	#2	250	250		0.625	0.0625
#0		0	0		0	0

Standard curve를 사용하지 않을 경우 : Positive/Negative control을 준비합니다.

► Positive control

- Colorimetric assay : 20 mU/ml Horseradish Peroxidase Solution (#5) - 50 μ l
- Fluorometric assay : 2 mU/ml Horseradish Peroxidase Solution (#5) - 50 μ l

► Negative control

- 1X Reaction Buffer (without Peroxidase) - 50 μ l

실험 과정

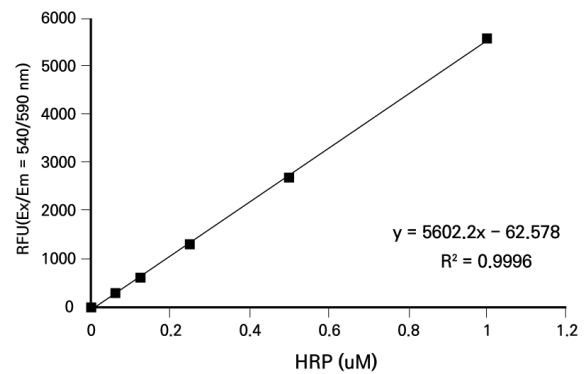
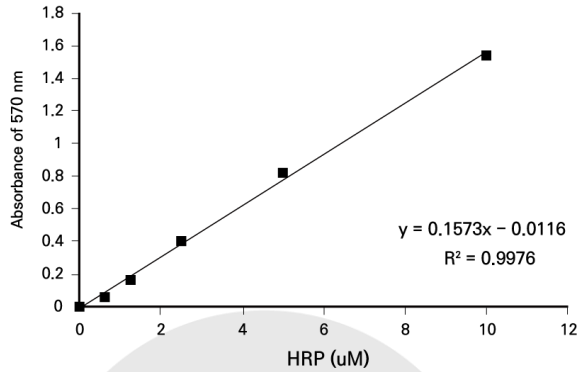
- ① 96-well Microplate에 준비된 HRP Standard solution을 각각 50 μ l/well씩 넣어 줍니다.
- ② 준비 된 Sample을 96-well Microplate에 50 μ l/well씩 넣어 줍니다.
- ③ Oxi-Probe/H₂O₂ Working solution을 아래 표와 같이 만들어 Sample과 Standard well에 50 μ l/well 씩 넣어 줍니다.

Components	Total volume (100 assays)
Oxi-Probe	100 μ l
20 mM Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	1 ml
1X Reaction Buffer	3.90 ml

- ④ Plate를 빛이 차단된 실온에서 30 min 간 반응시킵니다.
- ⑤ Microplate reader를 사용하여 반응 값을 측정합니다.
Fluorescence plate reader를 사용할 경우 – Excitation : 530~570 nm
Emission : 580~590 nm (Optimal Ex/Em = 540/590)
Absorbance plate reader를 사용할 경우 – 570 nm

결과 분석

- Standard curve를 사용할 경우 : 각 well의 측정값에서 Standard #0 값을 빼고 정리합니다.
- HRP 1 U(Unit) = Pyrogallol로부터 20초간 1 mg 의 Purpurogallin 생성을 촉매하는 효소의 양을 말합니다.
(at 20°C and pH 6.0)



HRP standard curve.

(Left – used the Absorbance plate reader, Right – used the Fluorescence plate reader)

Standard curve를 사용하지 않을 경우 : 다음과 같이 정리합니다.

Colorimetric assay

$$HRP (mU/ml) = \frac{A - B}{C - B} \times 10 mU/ml$$

A : 각 Well 당 측정값

B : Negative control의 측정값

C : Positive control의 측정값

Fluorometric assay

$$HRP (mU/ml) = \frac{A - B}{C - B} \times 1 mU/ml$$

A : 각 Well 당 측정값

B : Negative control의 측정값

C : Positive control의 측정값

Related products

- BO-TAC-200	OxiTec™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric)
- BO-TBR-200	OxiTec™ TBARS Assay Kit (Colorimetric)
- BO-GLU-200	OxiTec™ Glutathione(GSH/GSSG/Total) Assay Kit (Colorimetric)
- BO-SOD-250/500	OxiTec™ SOD Assay Kit (Colorimetric)
- BO-CAT-400	OxiTec™ Catalase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BO-DPPH-200/500	OxiTec™ DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)

*** 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