

# OxiTec™ Hydrogen Peroxide / Peroxidase Assay Kit

## (Colorimetric/ Fluorometric)

BO-PER-500, 100 Assays

### 제품 원리

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Peroxide Assay**

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

**Peroxidase Assay**

Sample + Oxi Probe + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  Resorufin

BIOMAX사의 OxiTec™ Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit는 Oxi-Probe와 Horseradish Peroxidase(HRP)를 이용하여 Sample 내에 존재하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혹은 Peroxidase의 활성을 분석하는 제품입니다. HRP가 있는 상태에서 Oxi-Probe는 샘플 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응하여 Resorufin을 형성하며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 10<sup>6</sup> 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) assay

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

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard preparation (Colorimetric assay)

- ① 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ l 와 D.W. 950  $\mu$ l를 혼합하여 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#6)를 만듭니다.
- ② 만들어진 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#6)와 1X Reaction Buffer를 아래 표와 같이 혼합하여 각각의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard solution을 제작합니다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard preparation (Fluorometric assay)

- ① 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ l와 D.W. 950  $\mu$ l를 혼합하여 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#6)를 만듭니다.
- ② 만들어진 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#6)와 1X Reaction Buffer를 아래 표와 같이 혼합하여 각각의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard solution을 제작합니다.

| Number | STD Stock | Vol. of STD Stock ( $\mu$ l) | 1X Reaction Buffer | Final Vol. Standard in well ( $\mu$ l) | Final H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Concentration ( $\mu$ 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  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solution (#5) - 50  $\mu$ l
- Fluorometric assay : 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solution (#5) - 50  $\mu$ l

#### ► Negative control

- 1X Reaction Buffer (without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - 50  $\mu$ l

## 실험 과정

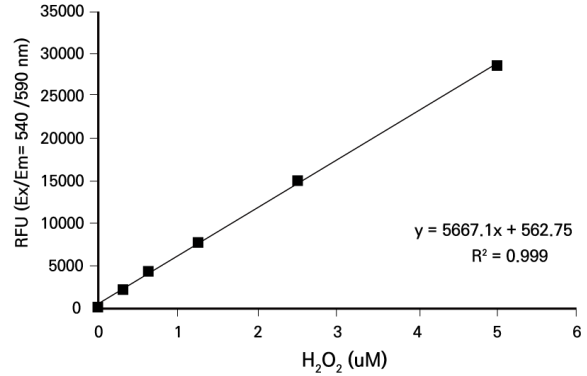
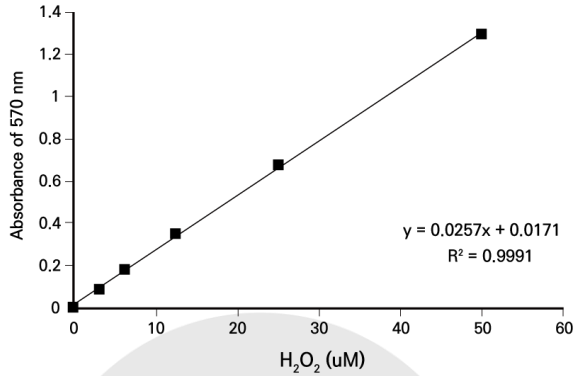
- ① 96-well Microplate에 준비된  $\text{H}_2\text{O}_2$  Standard solution을 각각 50  $\mu\text{l}$  /well 씩 넣어 줍니다.
- ② 준비 된 Sample을 96-well Microplate 에 50  $\mu\text{l}$ /well씩 넣어 줍니다.
- ③ Oxi-Probe/HRP Working solution을 아래 표와 같이 만들어 Sample과 Standard well에 50  $\mu\text{l}$ /well 씩 넣어 줍니다.

| Components                           | Total volume (100 assays) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Oxi-Probe                            | 100 $\mu\text{l}$         |
| 10 U/ml Horseradish-Peroxidase (HRP) | 200 $\mu\text{l}$         |
| 1X Reaction Buffer                   | 4.70 $\mu\text{l}$        |

- 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(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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  $\mu$ l 와 D.W. 980  $\mu$ 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  $\mu$ l와 D.W. 990  $\mu$ l를 혼합하여 100 mU/ml Peroxidase를 만듭니다.
- ② 만들어진 100 mU/ml Peroxidase 100  $\mu$ l와 D.W. 400  $\mu$ 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 ( $\mu$ l) | 1X Reaction Buffer | Final Vol. Standard in well ( $\mu$ l) | Final Peroxidase Concentration ( $\mu$ 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  $\mu$ l
- Fluorometric assay : 2 mU/ml Horseradish Peroxidase Solution (#5) - 50  $\mu$ l

#### ► Negative control

- 1X Reaction Buffer (without Peroxidase) - 50  $\mu$ l

## 실험 과정

- ① 96-well Microplate에 준비된 HRP Standard solution을 각각 50  $\mu$ l/well씩 넣어 줍니다.
- ② 준비 된 Sample을 96-well Microplate에 50  $\mu$ l/well씩 넣어 줍니다.
- ③ Oxi-Probe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Working solution을 아래 표와 같이 만들어 Sample과 Standard well에 50  $\mu$ l/well 씩 넣어 줍니다.

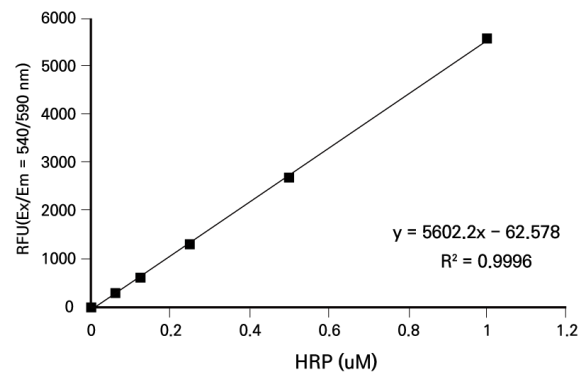
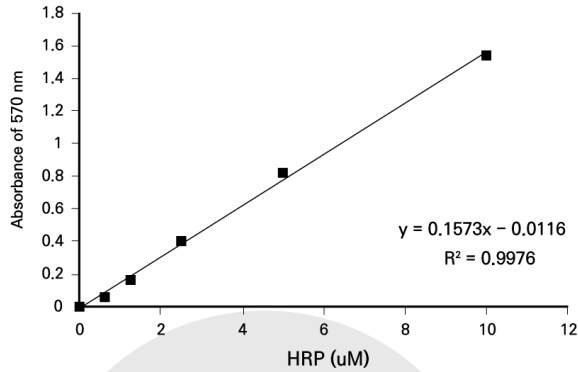
| Components                                               | Total volume (100 assays) |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|
| Oxi-Probe                                                | 100 $\mu$ l               |
| 20 mM Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 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](http://www.biomax.com)

Shopping mall : [www.biomaxmall.com](http://www.biomaxmall.com)

E-mail : [info@scgbiomax.com](mailto:info@scgbiomax.com)

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

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

**Note**