

# **EZ-Hydrogen Peroxide /Peroxidase Assay Kit**

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-PER500

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

## ▪ Product Description

산화적 스트레스(Oxidative Stress)는 Reactive Oxygen Species (ROS)와 antioxidant (항산화제)간의 불균형에 의해 발생되며, ROS의 과도한 축적은 DNA, 단백질 및 지질 세포막의 손상과 같은 세포적 손상을 초래합니다. 산화적 스트레스의 조건에서 발생하는 Hydrogen Peroxide ( $H_2O_2$ )와 같은 과산화물( Peroxide)은 ROS의 대표적인 산물 중 하나로 진핵세포에서는 유독하며, 높은 농도에서는 DNA, 지질 단백질의 산화를 일으켜 돌연변이 유발이나 세포사멸을 일으키기도 합니다. peroxide에 의한 세포적 손상은 노화, 천식, 관절염, 당뇨병, 심혈관 질환, 신경성 퇴행성 질환 등 여러 질환의 발병과도 관계가 있습니다.

EZ-Hydrogen Peroxide/Peroxidase assay kit는 Oxi-Probe를 사용하여 Hydrogen Peroxide ( $H_2O_2$ ) 또는 Peroxidase 활성을 측정할 수 있는 제품으로 간단한 실험 방법과 민감도를 가지는 제품입니다.

본 Kit는 실험 샘플(세포나 조직 등)이 가지고 있는  $H_2O_2$  뿐만 아니라 효소 관련 반응을 통해 발생하는  $H_2O_2$  검출 시에도 사용이 가능하며, 적은 양의 Hydrogen Peroxide 또는 Peroxidase 활성을 검출할 수 있습니다.

## ▪ Kit Contents and Storage Conditions

| Components                                  | 500 assay     | Storage |
|---|---------------|---------|
| ● Oxi-Probe (MW=257)                        | 5 vials       |         |
| ● Dimethylsulfoxide (DMSO), anhydrous       | 700 $\mu\ell$ |         |
| ● Horseradish peroxidase (HRP, 10U**)       | 1 vial        | -20°C   |
| ● Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , 3%, MW=34) | 200 $\mu\ell$ |         |
| 5X Reaction Buffer (pH 7.4, 0.25 M)         | 28 ml         |         |

\* 개봉 전 Kit 는 -20°C에서 6개월간 안정합니다.

\* Oxi-Probe 시약의 경우 공기에 매우 민감합니다. 개봉 후 빠른 시간 내에 사용을 권장하며, 반드시 빛의 노출에 주의 하십시오.

\*\* HRP 1U(unit) = Pyrogallol로부터 20초간 1mg의 purpurogallin 생성을 촉매하는 효소의 양. (at 20°C and pH 6.0)

## ■ Preparation of Stock Solution

| Solution  | Preparation  | Storage  |
|---|--|--|
| 10mM Oxi-Probe  | Oxi-Probe와 DMSO vial을 실온에서 충분히 녹여 줍니다.<br>하나의 Oxi-Probe vial에 60 $\mu$ l DMSO를 넣어 혼합합니다.<br>*Oxi-Probe 1vial 당 100 assay가 가능합니다. | 개봉한 vial은 당일 사용하며 남은 용액은 -20°C에 보관하시고, 사용 직전 혼합하여 사용하시기 바랍니다.<br><b>**Protect from light</b> |
| 1X Reaction Buffer                                      | 4ml의 5X Reaction Buffer 와 16ml deionized water (dH <sub>2</sub> O)을 혼합합니다.   |  |
| 10U/ml horseradish-peroxidase (HRP)                     | HRP vial에 1ml 1X Reaction Buffer를 넣어 혼합합니다.  | 남은 용액은 작은 용량으로 분주하여 -20 °C에서 보관하십시오.   |
| 20mM Hydrogen-peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 23 $\mu$ l의 3.0 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 와 977 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O를 혼합합니다.  | 혼합한 용액은 안정성이 매우 낮아 보관이 어렵습니다. 실험 시 필요량만 섞어 사용하시기 바랍니다.                                       |

\* 본 protocol은 96well microplate (total volume 100 $\mu$ l)를 사용하여 측정하는데 최적화 되어있습니다.

\* Standard fluorometer나 다른 크기의 microplate을 사용할 경우, 그에 맞는 볼륨으로 조정하여 사용하십시오.

## ■ Interference

- Oxi-Probe 반응에 의해 생성되는 반응물인 Resorufin은 dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol 과 같은 thiol계 물질에 불안정 합니다.
- 실험 진행 시 sample에 함유된 DTT와 2-mercaptoethanol의 최종 농도는 10  $\mu$ M 보다 높지 않아야 합니다.
- 실험진행 시 pH에 유의하여 주십시오 (적정 pH=7~8).
- 반응최종산물인 Resorufin의 흡광 혹은 형광 측정값은 pH에 의해 변화됩니다. pK<sub>a</sub>=6.0 미만에서는 Resorufin의 흡광 또는 형광 파장이 달라지며 감도가 현저하게 떨어집니다. 또한 Oxi-Probe는 pH 8.5 이상에서는 불안정하여 정확한 측정이 어렵습니다. 따라서, 실험진행 시 pH 7~8 에서 진행해야 함을 유의하여 주시고, kit에 포함되어 있는 완충액 (Reaction Buffer, pH 7.4)을 사용하여 주시기 바랍니다.

## ▪ Preparation of Samples

### 1. Cell Culture Supernatant

- ① 용해되지 않은 particle들을 제거하기 위해 10,000 rpm, 5 min 동안 centrifuge 합니다.
- ② Supernatant는 직접 또는 희석하여 분석이 가능합니다. 단,  $H_2O_2$  standard 범위 내에 들어가야 합니다.
- ③ 혈청(serum)은 분석 시 간섭을 주기 때문에 제거를 하거나 분석을 권장 드리지 않습니다.

### 2. Cell Lysate

- ①  $1 \sim 2 \times 10^6$  cells/mL을 PBS나 1X Assay Buffer를 넣고 재현탁(Resuspend) 합니다. (세포 수는 세포의 종류에 따라 다르게 진행 가능합니다.)
- ② 재현탁한 용액은 얼음 위에서 Homogenize나 sonicate 합니다.
- ③ Centrifuge 하여 debris를 제거하고 상층액을 사용합니다.
- ④ 상층액은  $H_2O_2$  standard 범위 내에 들어가도록 직접 또는 희석하여 사용합니다.

### 3. Plasma or Urine

- ① 용해되지 않은 particle들을 제거하기 위해 10,000 rpm, 5 min 동안 centrifuge 합니다.
- ② Supernatant는 직접 또는 희석하여 분석이 가능합니다. 단,  $H_2O_2$  standard 범위 내에 들어가야 합니다.

## **Notes:**

1. 모든 샘플은 즉시 분석해야 하며, 그렇지 않은 경우  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 약 1달 정도 보관 가능합니다. 그러나 시료의 최적 실험 조건은 실험자가 조절해야 합니다. 실험을 진행할 때 항상 standard curve 용액을 같이 진행하십시오.
2. 시료에 존재하는 총  $H_2O_2$ 와 peroxidase 양을 정확히 측정하기 위해 serial dilution하여 측정하십시오. 과량의  $H_2O_2$  또는 peroxidase 가 반응 생성물을 더 산화시킬 수 있기 때문에 매우 높은 농도의  $H_2O_2$  ( $\geq$  약  $500\text{ }\mu\text{M}$ , 최종 농도) 또는 peroxidase ( $\geq$  약  $100\text{ mU/mL}$ )는 측정값을 낮출 수 있습니다.
3. NADH농도가 약  $10\text{ }\mu\text{M}$  이상이거나, glutathione 농도가 약  $50\text{ }\mu\text{M}$  이상인 분석을 방해하여 정확한 측정값을 얻을 수 없습니다. 이러한 간섭을 최소화하기 위해서는 superoxide dismutase(SOD)를  $40\text{ U/mL}$ 의 최종 농도가 되도록 첨가해주는 것이 좋을 수도 있습니다.

## ▪ General Protocol

### I . Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Assay

#### 1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard preparation

: 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution 과 1X Reaction Buffer를 아래와 같이 혼합하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard solution을 제조합니다.

- ① Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.
- ② Standard curve를 사용하지 않을 경우에는 positive/negative control을 준비하십시오.
  - Positive control: 10μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution - 50μℓ
  - Negative control: 1X Reaction Buffer (without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - 50μℓ

| Standard Tube No. | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> standard | 20 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 1X Reaction Buffer | Final H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Concentration |
|-------------------|--|-------------------------------------|--------------------|---|
| 1                 | 10 μM                                  | 0.5 μℓ                              | 999.5 μℓ           | 5 μM  |
| 2                 | 5 μM                                   | 500 of Tube #1                      | 500 μℓ             | 2.5 μM  |
| 3                 | 2.5 μM                                 | 500 of Tube #2                      | 500 μℓ             | 1.25 μM   |
| 4                 | 1.25 μM                                | 500 of Tube #3                      | 500 μℓ             | 0.625 μM  |
| 5                 | 0.625 μM                               | 500 of Tube #4                      | 500 μℓ             | 0.3125 μM   |
| 6                 | 0.3125 μM                              | 500 of Tube #5                      | 500 μℓ             | 0.15625 μM  |
| 7                 | 0.15625 μM                             | 500 of Tube #6                      | 500 μℓ             | 0.078125 μM                                       |
| 8                 | 0 μM                                   | 0                                   | 500 μℓ             | 0 μM  |

**Table.** protocol for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard solution

2. 96well plate에 1에서 준비한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard solution을 각각 50μℓ씩 넣어 줍니다.
  - 정확한 측정을 위해 standard및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험 하시는 것이 좋습니다.

#### 3. Sample preparation

준비된 sample을 96well plate에 50μℓ씩 넣어 줍니다.

- Sample에 포함된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 너무 높은 경우 반응의 최종 산물인 resorufin을 산화시켜 정확한 측정이 어렵습니다. 예비 실험을 통해 측정하고자 하는 샘플을 serial dilution 하여 샘플의 대략적인 양을 결정합니다. (sample 희석 시 1x Reaction Buffer를 이용합니다.)

#### 4. Oxi-Probe/HRP Working Solution preparation: (100assay)

| Components                          | Volume |
|-------------------------------------|--------|
| 10mM Oxi-Probe                      | 50μℓ   |
| 10U/ml horseradish-peroxidase (HRP) | 100μℓ  |
| 1X Reaction Buffer                  | 4.85mℓ |

**Table.** protocol for Oxi-Probe/HRP Working Solution

5. Oxi-Probe/HRP Working Solution을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard solution (or control)과 sample이 들어있는 plate의 각 well에 50μℓ씩 넣어 줍니다.
6. Plate를 빛이 차단된 실온에서 30분간 반응시킵니다.
7. 반응이 끝난 plate는 plate reader를 사용하여 반응 값을 측정합니다.
  - ① Fluorescence plate reader를 사용할 경우 – Excitation: 530 ~ 560nm  
Emission : 580 ~ 590nm  
(optimal Ex/Em = 540/590)
  - ② Absorbance plate reader를 사용할 경우 – 560nm
8. Calculation
  - ① Standard curve를 사용할 경우: 각 well의 측정값에서 No- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> control (= standard #8 )값을 빼고 정리합니다.
  - ② Standard curve를 사용하지 않을 경우: 다음과 같이 정리합니다.

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{M}) = \frac{\text{A} - \text{B}}{\text{C} - \text{B}} \times 5 \mu\text{M}$$

A : 각 well 당 측정값

B : Negative Control의 측정값

C : Positive Control의 측정값

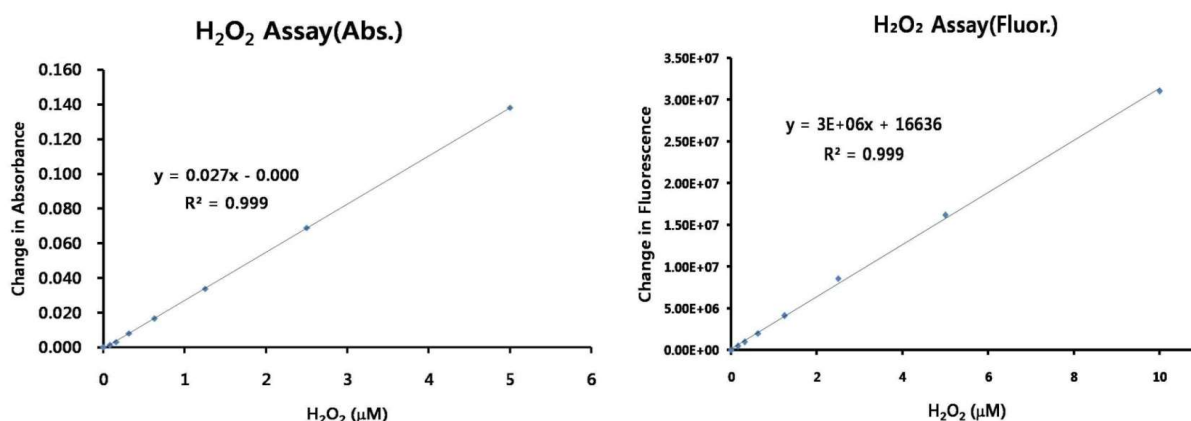


Fig. Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) standard curve. Assay was performed following the kit protocol.  
(Left - used the absorbance plate reader, Right - used the Fluorescence plate reader)

## II. Peroxidase Assay

### 1. Peroxidase standard preparation

: 10U/mL horseradish-peroxidase (HRP)를 1X Reaction Buffer를 사용하여 10mU/mL로 (1/1,000) 희석합니다.

위에서 희석해둔 10mU/mL HRP와 1X Reaction Buffer를 아래와 같이 혼합하여 HRP standard solution을 만들어 줍니다.

- ① Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.
- ② Standard curve를 사용하지 않을 경우에는 positive/negative control을 준비하십시오.
  - Positive control: 2 mU/mL horseradish-peroxidase (HRP) - 50 $\mu$ l
  - Negative control: 1X Reaction Buffer (without HRP) - 50 $\mu$ l

| Standard Tube No. | HRP standard  | 10mU/mL HRP    | 1X Reaction Buffer | Final HRP Concentration |
|-------------------|---------------|----------------|--------------------|-------------------------|
| 1                 | 2 mU/mL       | 200 $\mu$ l    | 800 $\mu$ l        | 1 mU/mL                 |
| 2                 | 1 mU/mL       | 500 of Tube #1 | 500 $\mu$ l        | 0.5 mU/mL               |
| 3                 | 0.5 mU/mL     | 500 of Tube #2 | 500 $\mu$ l        | 0.25 mU/mL              |
| 4                 | 0.25 mU/mL    | 500 of Tube #3 | 500 $\mu$ l        | 0.125 mU/mL             |
| 5                 | 0.125 mU/mL   | 500 of Tube #4 | 500 $\mu$ l        | 0.0625 mU/mL            |
| 6                 | 0.0625 mU/mL  | 500 of Tube #5 | 500 $\mu$ l        | 0.03125 mU/mL           |
| 7                 | 0.03125 mU/mL | 500 of Tube #6 | 500 $\mu$ l        | 0.015625 mU/mL          |
| 8                 | 0 mU/mL       | 0              | 500 $\mu$ l        | 0 mU/mL                 |

Table. protocol for HRP standard solution

### 2. 96well plate에 1에서 준비한 HRP standard solution을 각각 50 $\mu$ l씩 넣어 줍니다.

- 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험 하시는 것이 좋습니다.

### 3. Sample preparation

준비된 sample을 96well plate에 50 $\mu$ l씩 넣어 줍니다.

- Sample에 포함된 HRP의 농도가 너무 높은 경우 반응의 최종 산물인 resorufin을 산화 시켜 정확한 측정이 어렵습니다. 예비 실험을 통해 측정하고자 하는 샘플을 serial dilution 하여 샘플의 대략적인 양을 결정합니다. (sample 희석 시 1x Reaction Buffer를 이용합니다.)

### 4. Oxi-Probe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Working Solution preparation: (100assay)

| Components  | Volume      |
|---|-------------|
| 10mM Oxi-Probe  | 50 $\mu$ l  |
| 20mM Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 500 $\mu$ l |
| 1X Reaction Buffer                                      | 4.45mL      |

Table. protocol for Oxi-Probe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Working Solution.

5. Oxi-Probe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Working Solution을 HRP standard solution (or control)과 sample이 들어있는 plate의 각 well에 50  $\mu$ l씩 넣어 줍니다.
6. Plate를 빛이 차단된 실온에서 30분간 반응시킵니다.
7. 반응이 끝난 plate는 plate reader를 사용하여 반응 값을 측정합니다.

① Fluorescence plate reader를 사용할 경우 – Excitation: 530 ~ 560nm  
Emission: 580 ~ 590nm  
(optimal Ex/Em = 540/590)

② Absorbance plate reader를 사용할 경우 – 560nm

## 8. Calculation

① Standard curve를 사용할 경우: 각 well의 측정값에서 No- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> control (= standard #8 )값을 빼고 정리합니다.

③ Standard curve를 사용하지 않을 경우: 다음과 같이 정리합니다.

$$\text{HRP } (\mu\text{M/mL}) = \frac{\text{A} - \text{B}}{\text{C} - \text{B}} \times 1 \mu\text{M/mL}$$

A : 각 well 당 측정값

B : Negative Control의 측정값

C : Positive Control의 측정값

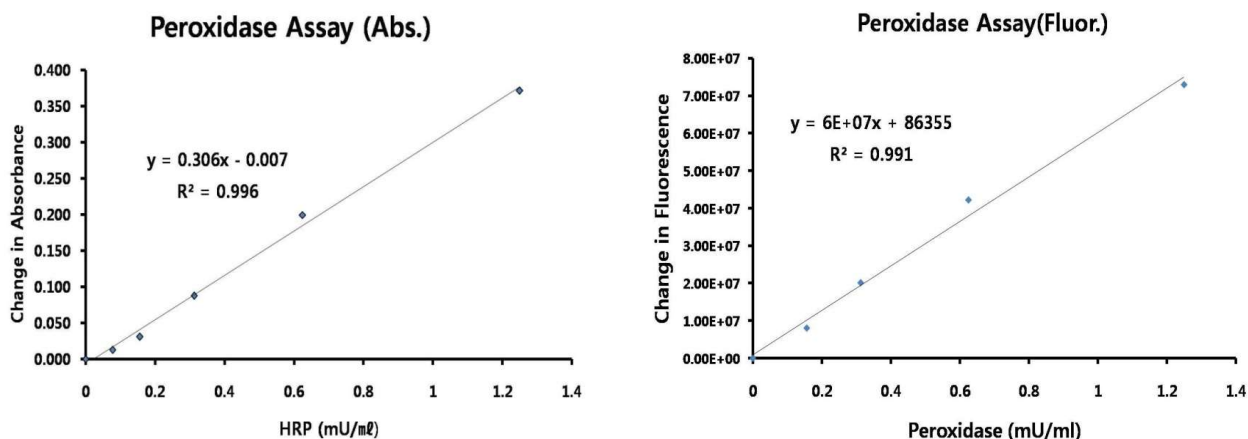


Fig. HRP standard curve. Assay was performed following the kit protocol.  
(Left - used the absorbance plate reader, Right - used the Fluorescence plate reader)