

**A. MİKROPLAKA TEST PROSEDÜRÜ (FLORESAN MODU):****NOTLAR:**

Analiz edilen her numune seti için, aynı reaktif partisi kullanılarak floresan modunda eş zamanlı olarak bir kalibrasyon eğrisi gerçekleştirilmelidir.

**H2O2 KALİBRASYON EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:**

Floresan modu için H2O2 standardını (şişe 5) 0,68 µg/mL (20 µM) ile seyreltin. Şişe 5 etiketine göre tam stok konsantrasyonuna dayalı olarak gerekli seyreltme faktörünü hesaplayın. Bu "seyreltilmiş standart"tır. %3 w/v solüsyonu için uygun seyreltme örneği aşağıda özetlenmiştir.

**Örnek:**

Şişe 5'in %3 w/v'lik belirtilen H2O2 konsantrasyonu içerdiği durumlarda, 22,7 µL şişe 5'i bir polipropilen tüpe dağıtarak seyreltin.

977,3 µL Tahlil Tamponu ekleyin. Vorteksleyerek iyice karıştırın. Bu çözeltinin 10 µL'sini ikinci bir polipropilen tüpe pipetleyerek ve 9,99 mL Tahlil Tamponu ekleyerek bir seri dilüsyon gerçekleştirin. Vorteksleyerek iyice karıştırın. Bu seyreltilmiş standarttır (0,68 µg/mL H2O2).

H2O2 çözeltilerini aşağıda açıklanan şekilde floresan tahlil prosedüründe kullanmak üzere aşağıdaki tabloda açıklandığı gibi hazırlayın (tahlilde 1-5, 0,0034-0,17 µg/mL H2O2 standartları). Hazırlandığı gün taze kullanın, bu standartlar ileride kullanılmak üzere saklanamaz.

Pipette into 13 mL polypropylene tubes	STD 1 0.0034 µg per mL	STD 2 0.034 µg per mL	STD 3 0.08 µg per mL	STD 4 0.114 µg per mL	STD 5 0.17 µg per mL
Assay Buffer	1.47 mL	1.2 mL	0.8 mL	0.5 mL	-
diluted standard	0.03 mL	0.3 mL	0.7 mL	1.0 mL	1.5 mL
total volume	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL

**TEST PROSEDÜRÜ :**

**Algılama yöntemi :** Floresan

**Uyarma :** 530-560 nm

**Emisyon :** ~ 590 nm

**Mikroplaka :** 96 oyuklu  
(örn. siyah, düz tabanlı, polistiren)

**Sıcaklık :** ~ 25°C

**Nihai hacim :** 0,10 mL

**Doğrusallık :** Test başına 0,0034-0,17 µg/mL  
H2O2 (tahlil içinde 0,1-5 µM)

Pipette into wells	Blank	Sample	Standard
Assay Buffer	0.050 mL	0.040 mL	0.025 mL
sample	-	0.010 mL	-
standards 1 - 5	-	-	0.025 mL
Mix*, allow the reaction to equilibrate to temperature for 5 min and start the reaction by addition of:			
working solution	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
Mix* and read the absorbance of the solutions (Abs) after exactly 30 min.			

\* örneğin mikroplaka çalkalayıcı, mikroplaka okuyucuda çalkalama işlevi veya tekrarlanan aspirasyon (örneğin 50-100 µL hacme ayarlanmış bir pipetör kullanarak) kullanma

**B. MİKROPLAKA TEST PROSEDÜRÜ (ABSORBANS MODU):****H2O2 STANDARDININ HAZIRLANMASI:**

Absorbans modu için, H2O2 standardını (şişe 5) 6,8 µg/mL'ye (200 µM) seyrelterek tek noktalı bir standart hazırlayın. Şişe 5 etiketine göre tam stok konsantrasyonuna dayalı olarak gerekli seyreltme faktörünü hesaplayın. Bu "seyreltilmiş standart"tır. %3 w/v solüsyonu için uygun bir seyreltme örneği aşağıda özetlenmiştir.

**Örnek:**

Şişe 5'in belirtilen H2O2 konsantrasyonu %3 w/v içerdiği durumda, 22,7 µL şişe 5'i bir polipropilen tüpe dağıtarak seyreltin. 977,3 µL Tahlil Tamponu ekleyin. Vorteksleyerek iyice karıştırın. Bu solüsyondan 10 µL'yi ikinci bir polipropilen tüpe pipetleyerek ve 990 µL Tahlil Tamponu ekleyerek bir seri dilüsyon gerçekleştirin. Vorteksleyerek iyice karıştırın. Bu, seyreltilmiş standarttır (6,8 µg/mL H2O2).

**TEST PROSEDÜRÜ :**

**Algılama yöntemi :** Absorbans

**Uyarma :** 570 nm

**Mikroplaka :** 96 oyuklu (örn. şeffaf düz tabanlı, cam veya plastik)

**Sıcaklık :** ~ 25°C

**Nihai hacim :** 0,10 mL

**Doğrusallık :** Test başına 0,03-0,68 µg/mL H2O2 (tahlil içinde 1-20 µM)

Pipette into cuvettes	Blank	Sample	Standard
Assay Buffer	0.050 mL	0.040 mL	0.045 mL
sample	-	0.010 mL	-
<b>diluted standard</b>	-	-	0.005 mL
Mix*, allow the reaction to equilibrate to temperature for 5 min and start the reaction by addition of:			
working solution	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
Mix* and read the absorbance of the solutions (A <sub>1</sub> ) at the end of the reaction (~ 30 min).			

\* Duyarlılığın artırılması gerekiyorsa testteki numune hacmi 0,04 mL'ye yükseltilebilir. Numune hacmi artırılırsa, çözelti 1'in (Tahlil Tamponu) hacmi orantılı olarak azaltılmalıdır.

\*\* örneğin mikroplaka çalkalayıcı, mikroplaka okuyucuda çalkalama işlevi veya tekrarlanan aspirasyon (örn. 50-100 µL hacimde bir pipet seti kullanarak) kullanarak.

**C. MANUEL TEST PROSEDÜRÜ (ABSORBANS MODU):**

Bu tahlil protokolünde sayfa 7'de açıklandığı gibi 6,8 µg/mL (200 µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seyreltilmiş standart solüsyon hazırlayın.

**TEST PROSEDÜRÜ :**

<b>Algılama yöntemi</b>	: Absorbans
<b>Uyarma</b>	: 570 nm
<b>Küvet</b>	: 1 cm ışık yolu (cam veya plastik)
<b>Sıcaklık</b>	: 25°C
<b>Nihai hacim</b>	: 1,0 mL
<b>Basit Çözüm</b>	: Test başına 0,034-0,68 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (tahlil içinde 1-20 µM)
<b>Havaya Karşı Okuma</b>	: (ışık yolunda küvet olmadan) veya suya karşı okuyun

Pipette into cuvettes	Blank	Sample	Standard
assay buffer	0.50 mL	0.40 mL	0.45 mL
sample	-	0.10 mL*	-
diluted standard	-	-	0.05 mL
Mix*, allow the reaction to equilibrate to temperature for 5 min and start the reaction by addition of:			
working solution	0.50 mL	0.50 mL	0.50 mL
Mix** and read the absorbance of the solutions (Abs) after exactly 30 min.			

\* Duyarlılıkta bir artış gerekiyorsa testteki örnek hacmi 0,4 mL'ye yükseltilebilir. Numune hacmi artırılırsa, çözelti 1'in (Tahlil Tamponu) hacmi orantılı olarak azaltılmalıdır.

\*\* örneğin plastik bir spatula ile veya küveti bir küvet kapağı veya Parafilm® ile kapattıktan sonra hafifçe ters çevirerek.

**D. OTO ANALİZÖR TEST PROSEDÜRÜ:****NOTLAR:**

Auto-Analyser formatında test edilen her numune seti için, aynı reaktif partisi kullanılarak aynı anda tek noktalı bir standart veya bir kalibrasyon eğrisi gerçekleştirilmelidir.

~ 100 tahlil için reaktif hazırlama şu şekilde yapılır:

- R1** : Tahlil tamponu, 10 mL  
**R2** : Çalışma solüsyonu, 10 mL

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standardı** : Seyreltilmiş bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standardı hazırlayın.