

Okvirni plan za peroksid:

Najvažnije karakteristike:

#1 Mjerenja istih ekstrakata u različitim vremenskim točkama moraju imati gotovo identične vrijednosti

Ovdje je potrebno izmjeriti par uzoraka pri različitim vremenima u različitim puferima da vidimo što je najbolje. (Kalij-cijanid I etanol su obećavajuće supstance gledajući u literaturu)

Nužni eksperimenti:

1. Mjerenje više alikvota istoga ekstrakta u različitim puferima uzastopno svakih nekoliko minuta.

-#2 Vodikov peroksid dodan u uzorak mora imati apsorbanciju gotovo identičnu apsorbanciji uzorka + dodanog peroksida

Ovdje je opet riječ o puferu I metodi ekstrakcije.

Nužni eksperimenti:

1. Napaviti "spike" s H_2O_2 prilikom same ekstrakcije I poslije ekstrakcije te izmjeriti koliko je uspješno "vraćen"

#3 Interni standard mora biti jednakog nagiba kao I baždarac (eksterni standard)

Nužni eksperiment:

1. Pripremiti interne I eksterne standarde I usporediti.

#4 Detektirani peroksid mora biti linearan s volumenom dodanog ekstrakta

Nužni eksperiment:

1. Iz jednog ili dva alikvota dodati različiti volumen ekstrakta I vidjeti je li linearno

#5 Imati negativnu I pozitivnu kontrolu

Negativna kontrola nam ovdje može I djelovati kao kotrola I za ostale peroksidge/oksidirajuće tvari dokle god imamo dovoljno specifičnu metodu uništenja samo peroksida.

Nužni eksperiment:

1. Idealno, ali ne nužno, specifičnom metodom ukloniti H_2O_2 iz uzorka (Recimo, uklanjanjem denaturirajućih uvjeta I dodatkom katalaze). Te izmjeriti I usporediti apsorbanciju s uzorkom.
2. Za pozitivnu kontrolu samo dodati H_2O_2 . (Nije osobito važna, poprilično je jasno je li eksperiment uspješan sa ili bez nje)

#6 Izmjeren peroksid mora biti linearan s omjeroma masa:volumen ekstrakta

za FOX s većom masom tkiva opada izmjejni peroksid. Uglavnom se smatra da je to do reakcija tijekom samog postupka ekstrakcije. Ovo nam je opet povezano s puferima pa će vjerojatno biti razrješeno slično kao gore navedeno.

Nužni eksperimenti za rješiti problem:

1. Izmejriti isti uzorak u različitim omjerima masa:volumen

Manje važne karakteristike:

A) Povećati osjetljivost

- Nema ništa specifično u planu za ovo, ali vjj se bude vidjelo u onim eksperimentima s puferima koji je najbolji, stvarno nije osobito bitno da već osjetliva metodu načinimo više osjetljivom

B) Neosjetljivost na ostale perokside I druge interferirajuće tvari:

-Ovdje su korisni I podaci iz negativne kontrole

-

D) Jeftiniji reagens

SCN je reagens koji se koristi za detekciju Fe^{3+} u količinama sličnima našim I par radova ga rabi kao reagens za određivanje lipidnih peroksida. Bilo bi zgosno da radi jer je jeftiniji od XO I onda možete šparati na budžetu:

Nužni eksperimenti za razrješiti točku:

1. Probati načiniti baždarni pravac sa SCN umjesto FOX pri nama znajmljivim koncentracijama H_2O_2 .
2. Ako je gornje uspješno odrediti stabilnost obojanosti I njeno vremensko kretanje
3. Ako je sve gorne zadovoljavajuće Odrediti područje linearnosti I početi ga rabiti umjesto FOX.

E) Neosjetljivost na kisik

- Ovo treba još ustanoviti kako optimalno ispitati.

D) Manje ručna ekstrakcija

- Za ekstrakciju bi bilo optimalno da ne uključuje postupak toliko varijabilan kao rabljenje tarionika, optimalno bi bilo da se treska u nekom puferu koji sve lijepo ekstrahira, Ovome još treba teorijske dorade, ali mislim da bi peroksid trebao moći proći kroz stanične stijenke pa da se možda može I zaobići to tarenje I tučkanje.

Eksperiment:

1. Probati metodu ekstrakcije samo s treskanjem, uz modifikaciju ekstrakcijskog pufera.