

过氧化氢含量（H₂O₂）试剂盒

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC3595

规格：100T/96S

产品内容：

试剂一：丙酮100mL×1瓶，4℃保存；（自备）

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入3mL浓盐酸充分溶解备用。用不完的试剂4℃保存；

试剂三：液体6mL×1瓶，4℃保存；

试剂四：液体30mL×1瓶，4℃保存；

标准品：液体1mL×1支，4℃保存，1mmol/mL H₂O₂标准液。

产品说明：

H₂O₂是生物体内最常见的活性氧分子，主要由SOD和XOD等催化产生，由CAT和POD等催化降解。H₂O₂不仅是重要的活性氧之一，也是活性氧相互转化的枢纽。一方面，H₂O₂可以直接或间接地氧化细胞内核酸，蛋白质等生物大分子，并使细胞膜遭受损害，从而加速细胞的衰老和解体；另一方面H₂O₂也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

H₂O₂与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物，在415nm有特征吸收。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、丙酮、浓盐酸、研钵和冰。

操作步骤：

一、H₂O₂提取：

1、细菌或细胞样品的制备：

收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500万细菌或细胞加入1mL试剂一，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2. 组织样品的制备：

称取约0.1g组织，加入1mL试剂一进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：按照每100μL血清（浆）加入0.9mL试剂一的比例充分混匀；8000g 4℃离心

10min, 取上清, 置冰上待测。

注意事项:

- 1、由于试剂一易挥发, 试剂一必须先预冷再加, 研磨时必须在冰上研磨。
- 2、本试剂盒中试剂的挥发性较高, 请带一次性手套和口罩。

二、测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至415nm, 蒸馏水调零。
- 2、将试剂二、三和四37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 水浴10min以上。
- 3、如果用96孔板将则用丙酮将1mmol/mL 标准液稀释为2 μ mol /mL 的标准溶液, 用微量玻璃比色
则用丙酮将1mmol/mL 标准液稀释为1 μ mol /mL 的标准溶液。
- 4、在EP管中按顺序加入下列试剂

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管	对照管
样本	250		
标准溶液		250	
试剂一			250
试剂二	25	25	25
试剂三	50	50	50
4000g, 常温离心10min, 弃上清, 留沉淀			
试剂四	250	250	250

加入试剂四溶解沉淀后 (可先用丙酮清洗3-5次来洗去植物色素), 室温静置5min, 取200 μ L 转移至微量玻璃比色皿或96孔板中测定415nm处吸光值。对照管只要做一次即可。计算 ΔA 测定=A 测定管-A对照管, ΔA 标准=A标准管-A对照管。

三、H₂O₂含量计算:

- 1、按照细菌、细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{cell}) &= \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标液}) \times V \text{样本} \div (500 \times V \text{样本} \div V \text{提取}) \\ &= 0.004 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准}。 \end{aligned}$$

- 2、按组织鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{含量} (\mu\text{mol}/\text{g} \text{鲜重}) &= \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标液}) \times V \text{样本} \div (V \text{样本} \div V \text{提取} \times W) \\ &= 2 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div W。 \end{aligned}$$

- 3、按照蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{含量} (\mu\text{mol}/\text{mg} \text{prot}) &= \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标液}) \times V \text{样本} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{样本}) \\ &= 2 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div C_{\text{pr}}。 \end{aligned}$$

- 4、按血清 (浆) 体积计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) &= \Delta A \text{测定} \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标液}) \times 10 \\ &= 20 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准}。 \end{aligned}$$

500: 细胞或细菌总数, 万个; C标液: H₂O₂标准溶液浓度, 2 μ mol/mL; V样本: 加入的样本体积, 0.25mL; W: 组织鲜重, g; V提取: 提取过程中所用体积, 1mL; C_{pr}: 样品蛋白浓度,

mg/mL; 10: 血清稀释倍数, $[0.1\text{mL血清(浆)} + 0.9\text{mL试剂一}] \div 0.1\text{mL血清(浆)} = 10$ 。

注意: 如果用微量玻璃比色皿 (光径 $d=1\text{cm}$) 将 1mmol/mL 标准液稀释为 $1\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液。计算公式亦作改变。

