

过氧化氢含量（H₂O₂）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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，。

测定原理：

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、微量石英比色皿/96孔板、丙酮100mL、浓盐酸5mL、研钵和冰。

试剂的组成和配制：

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；（溶解时间较长，约30min，可40℃-60℃加热，务必提前准备）

试剂三：液体10mL×1瓶，4℃保存；

试剂四：液体30mL×1瓶，4℃保存；

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；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；用试剂一定容至1mL；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2. 组织样品的制备：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆；转移至EP管中，用试剂一定容至1mL，8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：直接检测。

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. 在EP管中按顺序加入下列试剂

试剂名称（ μ L）	测定	对照
样本	250	
试剂一		250
试剂二	25	25

试剂三	50	50
-----	----	----

4000g, 25°C离心10min, 弃上清, 留沉淀

试剂四	250	250
-----	-----	-----

加入试剂四溶解沉淀后, 室温静置5min, 取200 μ L转移至微量石英比色皿或96孔板中测定415nm处吸光值A。对照管只要做一次即可。计算
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

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。

H2O2含量计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归曲线, $y = 0.7488x + 0.0006$ (x为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y为 ΔA)。

2、血清(浆)中H2O2含量的计算:

$$\text{H2O2含量} (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 = 1.34 \times (\Delta A - 0.0006)$$

3、细菌、细胞或动物组织中H2O2含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{H2O2含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 1.34 \times (\Delta A - 0.0006) \div \text{Cpr}$$

需要另外测定, 建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样本质量计算

$$\text{H2O2含量} (\mu\text{mol/g鲜重}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 1.34 \times (\Delta A - 0.0006) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\text{H2O2含量} (\mu\text{mol}/10^4) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0027 \times (\Delta A - 0.0006)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归曲线, $y = 0.3744x + 0.0006$ (x为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y为 ΔA)。

2、血清(浆)中H2O2含量的计算:

$$\text{H2O2含量} (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006)$$

3、细菌、细胞或组织中H2O2含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{H2O2含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div \text{Cpr}$$

需要另外测定, 建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样本质量计算

H_2O_2 含量($\mu\text{mol/g}$ 鲜重)=[$(\Delta A-0.0006) \div 0.3744 \times V_1$] \div ($W \times V_1 \div V_2$)= $2.67 \times (\Delta A-0.0006) \div W$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

H_2O_2 含量($\mu\text{mol}/10^4$)=[$(\Delta A-0.0006) \div 0.3744 \times V_1$] \div ($500 \times V_1 \div V_2$)= $0.0054 \times (\Delta A-0.0006)$

V_1 : 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V_2 : 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万。

注意: 标曲线性范围为0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ -2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 吸光度 ΔA 线性范围为0.03-1, 若 ΔA 超过1则需要稀释, 计算公式乘以相应稀释倍数。

www.affandi-e.com