

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0615

Size: 50T/48S

## 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

#### 二、测定原理:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物, 在 415nm 有特征吸收。

#### 三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、丙酮、浓盐酸、研钵和冰。

#### 四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	丙酮 100mL × 1 瓶	4°C 保存	自备
试剂二	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前加入 6mL 浓盐酸充分溶解备用。用不完的试剂 4°C 保存
试剂三	液体 12mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	约 1mmol/mL 标准液

## 五、操作步骤：

### ● H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 提取：

#### 1、细菌、细胞或组织样品的制备

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 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 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，取全部上清液（注意吸取干净）置冰上待测。

#### 3、血清（浆）样品

按照每 100 μL 血清（浆）加入 0.9mL 试剂一的比例充分混匀。

## 六、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。

## 七、测定步骤和加样表

- 1、分光光度计预热 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、配制 1 μmol/mL 过氧化氢溶液。本试剂盒提供的过氧化氢浓度约为 1M。由于过氧化氢不是非常稳定，使用前需自行测定过氧化氢的实际浓度。把浓度约为 1mmol/mL 的过氧化氢用丙酮稀释 100 倍，使过氧化氢的浓度约为 10 μmol/mL。用分光光度计（石英比色皿）测定 A<sub>240</sub>。过氧化氢浓度(μmol/mL)=22.94× A<sub>240</sub>。从而计算出本试剂盒提供的过氧化氢的实际浓度。然后再根据实际的过氧化氢浓度配制 1 μmol/mL 过氧化氢溶液。

4、在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管	标准管	对照管
样本	吸取的量为全部上清液		
1 $\mu$ mol/mL 标准溶液		1000	
试剂一			1000
试剂二	100	100	100
试剂三	200	200	200
4000g, 常温离心 10min, 弃上清, 留沉淀			
试剂四	1000	1000	1000

加入试剂四溶解沉淀（可用丙酮清洗 3-5 次先洗去植物色素）室温静置 5min，倒入比色皿中，415nm 处，蒸馏水调零，记录测定管吸光度。对照管只需做一次即可。计算 $\Delta A$  测定=A 测定管-A 对照管， $\Delta A$  标准=A 标准管-A 对照管。

## 八、 $H_2O_2$ 含量计算：

### 1、按照细菌、细胞个数计算：

细菌或细胞中  $H_2O_2$  含量 ( $\mu\text{mol}/10^4$  细菌或细胞) =  $\Delta A$  测定  $\div$  ( $\Delta A$  标准  $\div$  C 标液)  $\times$  V 样本  $\div$  (500  $\times$  V 样本  $\div$  V 提取) = 0.002  $\times$   $\Delta A$  测定  $\div$   $\Delta A$  标准。

### 2、按组织鲜重计算：

组织中  $H_2O_2$  含量 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  鲜重) =  $\Delta A$  测定  $\div$  ( $\Delta A$  标准  $\div$  C 标液)  $\times$  V 样本  $\div$  (V 样本  $\div$  V 提取  $\times$  W) =  $\Delta A$  测定  $\div$   $\Delta A$  标准  $\div$  W。

### 3、按照蛋白浓度计算：

$H_2O_2$  含量 ( $\mu\text{mol}/\text{mg prot}$ ) =  $\Delta A$  测定  $\div$  ( $\Delta A$  标准  $\div$  C 标液)  $\times$  V 样本  $\div$  (Cpr  $\times$  V 样本) =  $\Delta A$  测定  $\div$   $\Delta A$  标准  $\div$  Cpr。

#### 4、按血清（浆）体积计算：

血清（浆）中  $H_2O_2$  含量 ( $\mu mol/mL$ ) =  $\Delta A$  测定  $\div$  ( $\Delta A$  标准  $\div$  C 标液)  $\times$  V 样本  $\div$  V 血清（浆） =  $10 \times \Delta A$  测定  $\div$   $\Delta A$  标准。

500：细胞个数，以万计；C 标液： $H_2O_2$  标准溶液浓度， $1 \mu mol/mL$ ；V 样本：加入的样本体积， $1mL$ ；W：组织鲜重，g；V 提取：提取过程中所用体积， $1mL$ ；Cpr：样品蛋白浓度， $mg/mL$ ；V 血清（浆）所用血清（浆）体积， $0.1mL$ 。