

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

过氧化氢 (H₂O₂) 含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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℃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（如遇不易溶解，可适当水浴锅50-60℃，10-20min）。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 H ₂ O ₂ 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 100 μL 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°C（哺乳动物）或 25°C（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_{240} 。过氧化氢浓度 (μmol/mL) = $22.94 \times A_{240}$ 。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 (μL)	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 200μL 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

H₂O₂ 含量计算:

- 1、按照细菌、细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标液}}) \times V_{\text{样本}} \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ &= 0.002 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}. \end{aligned}$$

- 2、按组织鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标液}}) \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) \\ &= 1 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W. \end{aligned}$$

- 3、按照蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标液}}) \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \\ &= 1 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

4、按血清（浆）体积计算：

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

500：细胞或细菌总数，万个；C标液：H₂O₂标准溶液浓度，1μmol/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；Cpr：样品蛋白浓度，mg/mL；10：血清稀释倍数，[0.1mL血清（浆）+0.9mL试剂一]÷0.1mL血清（浆）=10。