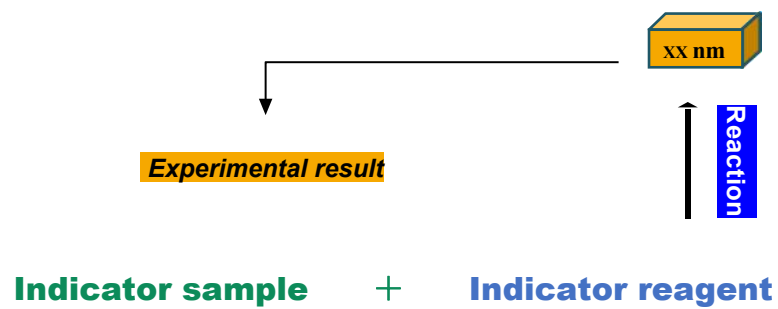


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

过氧化氢含量 (H_2O_2) 试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前取 2-3个预期差异较大的样本做预测定

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 6mL 浓盐酸充分溶解备用。用不完的试剂 4℃保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂四	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	—
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	约1mmol/mL 标准液

产品说明：

H_2O_2 是生物体内最常见的活性氧分子，主要由 SOD 和 XO 等催化产生，由 CAT 和 POD 等催化降解。 H_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

H_2O_2 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、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、丙酮、浓盐酸、研钵和冰。

操作步骤：

一、 H_2O_2 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。

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 μ L 血清（浆）加入 0.9mL 试剂一的比例充分混匀。

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_{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	测定管	标准管	对照管
样本	吸取的量为全部上清液		
1 μmol/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 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、细胞个数计算:

细菌或细胞中 H₂O₂ 含量 (μmol/10⁴ 细菌或细胞) = ΔA 测定 ÷ (ΔA 标准 ÷ C 标液) × V 样本 ÷ (500 × V 样本 ÷ V 提取) = $0.002 \times \Delta A$ 测定 ÷ ΔA 标准。

- 2、按组织鲜重计算:

组织中 H₂O₂ 含量 (μmol/g 鲜重) = ΔA 测定 ÷ (ΔA 标准 ÷ C 标液) × V 样本 ÷ (V 样本 ÷ V 提取 × W)

$$= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W。$$

- 3、按照蛋白浓度计算:

H₂O₂ 含量 (μmol/mg prot) = ΔA 测定 ÷ (ΔA 标准 ÷ C 标液) × V 样本 ÷ (Cpr × V 样本)

$$= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr。$$

4、按血清（浆）体积计算：

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

500：细胞个数，以万计；C 标液：H₂O₂ 标准溶液浓度，1 μmol/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。