

过氧化氢含量 (H₂O₂) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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

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 (μL)	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 200μL 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, μmol/mL; y 为 ΔA)。

2、血清(浆)中 H₂O₂ 含量的计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 = 1.34 \times (\Delta A - 0.0006)$$

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

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 1.34 \times (\Delta A - 0.0006) \div Cpr$$

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

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 1.34 \times (\Delta A - 0.0006) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0027 \times (\Delta A - 0.0006)$$

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, μmol/mL; y 为 ΔA)。

2、血清(浆)中 H₂O₂ 含量的计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006)$$

3、细菌、细胞或组织中 H₂O₂ 含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div Cpr$$

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

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0054 \times (\Delta A - 0.0006)$$

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。

注意: 标曲线性范围为 0.1 μ mol/mL-2 μ mol/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。