

过氧化氢(H₂O₂)含量检测试剂盒说明书

Hydrogen Peroxide Assay Kit

分光光度法

货号：AK304

规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

| 编号 | 规格 | 储存条件 |
|-------------------------|-----------|---|
| AK304-A(丙酮) | 100mL×1 瓶 | 自备，4℃保存 |
| AK304-B | 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(溶解时间较长，约 30min，务必提前准备) |
| AK304-C | 15mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| AK304-D | 60mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| AK304-标准品 (1mmol/mL) | 1mL×1 支 | 4℃保存 |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：过氧化氢(H₂O₂)是生物体内最常见的活性氧分子，主要由超氧化物歧化酶 (SOD) 和黄嘌呤氧化酶 (XOD) 等催化产生，由过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (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。

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。

自备用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、丙酮、浓盐酸、冰和蒸馏水。

H₂O₂ 提取：

1. 细菌、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) : AK304-A 体积 (mL) 为 500:1 的比例 (按照 500 万细菌或细胞加入 1mL AK304-A)，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)；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) : AK304-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK304-A)，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 0.1mL 血清 (浆) 加入 0.9mL AK304-A 的比例充分混匀，8000g 4℃ 离心 10min，取全部上清液 (注意吸取干净)，置冰上待测。

测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 415nm，蒸馏水调零。
2. 将 AK304-B、AK304-C 和 AK304-D 置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
3. 用丙酮将 1mmol/mL 标准液稀释为 1μmol/mL 的标准溶液。
4. 在 EP 管中按顺序加入下列试剂：

| 试剂名称 | 对照管 (μL) | 测定管 (μL) | 标准管 |
|---|----------|-----------|------|
| 样本 | | 吸取的量为全部上清 | |
| 1μmol/mL 标准溶液 | | | 1000 |
| AK304-A | 1000 | | |
| AK304-B | 100 | 100 | 100 |
| AK304-C | 200 | 200 | 200 |
| 4000g, 常温离心 10min, 弃上清, 留沉淀 (可用丙酮清洗 3-5 次先洗去植物色素) | | | |
| AK304-D | 1000 | 1000 | 1000 |
| 溶解沉淀后, 室温静置 5min, 倒入比色皿中, 测定 415nm 处吸光值 A。计算ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, ΔA 标准=A 标准管-A 对照管。 | | | |

注: 对照管只要做 1-2 次即可。

注意事项:

1. 由于丙酮易挥发, 丙酮必须先预冷再加, 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。
3. 如果样本吸光值大于 1, 建议将样本用 AK304-A 稀释后进行测定。

H₂O₂ 含量计算公式:

1. 血清 (浆) 中 H₂O₂ 含量计算:

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

2. 细菌、细胞或动物组织中 H₂O₂ 含量计算:

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (Cpr \times V \text{ 样本}) \\ &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr \end{aligned}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

(2) 按照样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \div V \text{ 提取} \times W) \\ &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

(3) 按照细菌或细胞个数计算:

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

注: 500: 细胞/细菌个数, 以万计; C 标液: H₂O₂ 标准溶液浓度, 1μmol/mL; V 样本: 加入的样本体积, 1mL; W: 组织质量, g; V 提取: 提取过程中所用体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V 血清 (浆): 所用血清 (浆) 体积, 0.1mL。