

过氧化氢(H₂O₂)含量检测试剂盒说明书

Hydrogen Peroxide Assay Kit

微量法

货号: AK305

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK305-A(丙酮)	100mL×1 瓶	自备, 4℃保存
AK305-B	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, 务必提前准备)
AK305-C	10mL×1 瓶	4℃保存
AK305-D	30mL×1 瓶	4℃保存
AK305-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/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、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): AK305-A 体积 (mL) 为 500:1 的比例 (按照 500 万细菌或细胞加入 1mL AK305-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): AK305-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK305-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 AK305-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/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 415nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK305-B、AK305-C 和 AK305-D 置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
3. 如果用 96 孔板将则用丙酮将 1mmol/mL 标准液稀释为 2μmol/mL 的标准溶液, 用微量玻璃比色皿则用丙酮将 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		250	
稀释后的标准溶液			250
AK305-A	250		
AK305-B	25	25	25
AK305-C	50	50	50
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)			
AK305-D	250	250	250
溶解沉淀后, 室温静置 5min, 取 200μL 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 然后测定 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 1.1, 建议将样本用 AK305-A 稀释后进行测定。

H₂O₂ 含量计算公式:

a. 按 96 孔板计算:

1. 血清 (浆) 中 H₂O₂ 含量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mL}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times 10 \\ &= 20 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (Cpr \times V \text{ 样本}) \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr \end{aligned}$$

※ 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

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \div V \text{ 提取} \times W) \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

(3) 按照细菌或细胞个数计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (500 \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \\ &= 0.004 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \end{aligned}$$

注: 500: 细胞/细菌个数, 以万计; C 标液: H₂O₂ 标准溶液浓度, 2μmol/mL; V 样本: 加入的样本体积, 0.25 mL; 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; 10: 血清稀释倍数。

b. 按微量玻璃比色皿计算:

将公式中的 C 标液-2μmol/mL 改为 C 标液-1μmol/mL 进行计算即可。