

过氧化氢 (H₂O₂) 含量检测试剂盒 E2076

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 也是许多氧化应激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。

试剂组成 (100 T):

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶 (自备)	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 丙酮自备。
- 2、试剂二: 临用前加入 3 mL 浓盐酸充分溶解备用, 用不完的试剂 4℃ 保存。
- 3、标准品: 1 mmol/mL H₂O₂ 标准液。

技术指标:

最低检出限: 0.0027 μmol/mL

线性范围: 0.0195-3 μmol/mL

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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/匀浆器和冰。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

细菌或细胞样本的制备：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。

组织样本的制备：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。

血清（浆）样本：按照每 100μL 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。

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℃（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（μL）	测定管	标准管	空白管
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（可先用丙酮清洗 3-5 次来洗去植物色素）			
试剂四	250	250	250

加入试剂四溶解沉淀后，室温静置 5min，取 200μL 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中测定 415nm 处吸光值（空白管只要做 1-2 次即可）。计算 ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管， ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管。

三、H₂O₂ 含量计算 A、按 96 孔板计算

1、按照细菌、细胞数量计算：

H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标液) \times V 样本 \div (500 \times V 样本 \div V 提取) = 0.004 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准

2、按组织质量计算：

H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 质量) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标液) \times V 样本 \div (V 样本 \div V 提取 \times W) = 2 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准 \div W

3、按照蛋白浓度计算：

H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标液) \times V 样本 \div (Cpr \times V 样本) = 2 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准 \div Cpr

4、按血清（浆）体积计算：

H_2O_2 含量($\mu\text{mol/mL}$)= ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标液) $\times 10=20\times\Delta A$ 测定 $\div\Delta A$ 标准

500: 细胞或细菌总数, 万个; C 标液: H_2O_2 标准溶液浓度, $2\mu\text{mol/mL}$; V 样本: 加入的样本体积, 0.25mL ; 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, [0.1mL 血清(浆) $+0.9\text{mL}$ 试剂一] $\div 0.1\text{mL}$ 血清(浆) $=10$ 。

B、按微量玻璃比色皿计算

将公式中的 C 标液- $2\mu\text{mol/mL}$ 改为 C 标液- $1\mu\text{mol/mL}$ 进行计算即可。

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。
- 3、如果样本吸光值大于 1.1，建议将样本用试剂一稀释后进行测定。

实验实例：

- 1、取 0.1g 心脏，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆； 8000g 4°C 离心 10min ，取全部上清液（注意吸取干净），置冰上，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 ΔA 测定= A 测定管- A 空白管= $0.083-0.046=0.039$ ， ΔA 标准= A 标准管- A 空白管= $0.824-0.046=0.778$ ，按样本质量计算含量得：

H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $2\times\Delta A$ 测定 $\div\Delta A$ 标准 $\div W=1\mu\text{mol/g}$ 质量。

- 2、取 0.1g 茶叶，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆； 8000g 4°C 离心 10min ，取全部上清液（注意吸取干净），置冰上，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 ΔA 测定= A 测定管- A 空白管= $0.221-0.046=0.175$ ， ΔA 标准= A 标准管- A 空白管= $0.824-0.046=0.778$ ，按样本质量计算含量得：

H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $2\times\Delta A$ 测定 $\div\Delta A$ 标准 $\div W=4.5\mu\text{mol/g}$ 质量。

参考文献：

[1] Satterfield C N, Bonnell A H. Interferences in titanium sulfate method for hydrogen peroxide[J]. Analytical Chemistry, 1955, 27(7): 1174-1175.

[2] Amin V M, Olson N F. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in milk[J]. Journal of Dairy Science, 1967, 50(4): 461-464.

[3] Sima Y H, Yao J M, Hou Y S, et al. Variations of hydrogen peroxide and catalase expression in Bombyx eggs during diapause initiation and termination[J]. Archives of insect biochemistry and physiology, 2011, 77(2): 72-80.