

## 过氧化氢（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）含量检测试剂盒说明书

规格：96 样      方法：酶标仪法

### 一、注意事项

- 1.使用前请通读一遍说明书再开始实验。
- 2.正式检测前选取 2~3 个预期差异较大的样本进行预检测。
- 3.本试剂盒仅用于科研。
- 4.由于试剂一易挥发，试剂一必须先预冷再加，样本研磨时必须在冰上进行。
- 5.本试剂盒中含易挥发试剂，请带一次性手套和口罩。

### 二、产品组分

| 试剂名称 | 试剂规格           | 保存条件 | 备注   |
|------|----------------|------|--|
| 试剂一  | 丙酮<br>100 mL×1 | 4℃   | 自备，使用前 4℃预冷  |
| 试剂二  | 粉末×1           | 4℃   | 临用前加入 3 mL 浓盐酸（自备）充分溶解备用。用不完的试剂 4℃保存；（溶解时间较长，约 30 min，可 40℃~60℃加热，请根据实验安排，提前溶解该试剂） |
| 试剂三  | 10 mL×1        | 4℃   |  |
| 试剂四  | 30 mL×1        | 4℃   |  |

### 三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

### 四、样品制备

- 1、血清、血浆、培养液等液体样品直接检测。
- 2、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（10<sup>4</sup> 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 1 mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；用试剂一定容至 1 mL；8000 g，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

3、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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆；转移至 1.5 mL 离心管中，用试剂一定容至 1 mL，8000g，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

### 五、测定步骤：

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 415 nm 处。
2. 将试剂二、三、四 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10 min 以上。
3. 在 1.5 mL 离心管中依次加入（加入下列试剂时确保准确，降低误差）：

| 试剂名称  | 空白管 | 测定管 |
|---|-----|-----|
| 样本（μL）  | 250 | -   |
| 试剂一（μL）   | -   | 250 |
| 试剂二（μL）   | 25  | 25  |
| 试剂三（μL）   | 50  | 50  |
| 混匀，4000 g，常温离心 10 min，弃上清，留沉淀。  |     |     |
| 试剂四（μL）   | 250 | 250 |
| 加入试剂四溶解沉淀后，室温静置 5 min，吸取 200 μL 于 96 孔板中测 415 nm 下吸光值 A。对照管只做 2~3 次即可。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。 |     |     |

### 六、计算：

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  $\Delta A$ ）。

- 1、血清（浆）中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的计算：

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

- 2、细菌、细胞或组织中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量计算

（1）按照蛋白浓度计算（需要另外测定）

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V_1] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \\ &= 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

（2）按照样本质量计算

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2)$$

$$= 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4) &= [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) \\ &= 0.0054 \times (\Delta A - 0.0006) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25 mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; 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。

## 八、产品简介

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。