

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

分光光度法 50 管/48 样

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:

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。

### 测定原理:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物, 在 415nm 有特征吸收。

### 试剂的组成和配制:

产品名称	OX001-50T/48S	Storage
试剂一: 丙酮	60ml (自备)	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 液体	15ml	4°C
试剂四: 液体	60ml	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存; 临用前加入 10ml 浓盐酸充分溶解备用。用不完的试剂 4°C 保存; (溶解时间较长, 约 30min, 可 40°C-60°C 加热溶解, 务必提前准备)

### 自备仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、丙酮 60ml、浓盐酸 10ml、研钵和冰。

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (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 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°C 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）	测定管	对照管
样本	吸取的量的为全部上清液	
试剂一		1000
试剂二	100	100
试剂三	200	200

4000g，25℃离心 10min，弃上清，留沉淀

试剂四	1000	1000
-----	------	------

加入试剂四溶解沉淀后，室温静置 5min，倒入比色皿中，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。

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量计算：

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  $\Delta A$ ）。

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

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

3、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

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

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，1ml；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 0.1μmol/ml 到 2μmol/ml，吸光度  $\Delta A$  线性范围为 0.07-1.5，若  $\Delta A$  超过 1.5 则需要稀释，计算公式乘以相应稀释倍数。

