北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

过氧化氢含量（H_2O_2）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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

货号：D17039

测定意义：

H_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

测定原理：

H_2O_2 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物，在 415nm 有特征吸收。

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、微量石英比色皿/96 孔板、丙酮 100mL、 浓盐酸 5mL、研钵和冰。

试剂的组成和配制：

试剂一：丙酮 100mL×1 瓶，4℃保存；（自备）

试剂二：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，可 40℃-60℃加热，务必提前准备)

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；

H_2O_2 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（10^4 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℃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、在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称（μL）	测定	对照
样本	250	
试剂一		250
试剂二	25	25
试剂三	50	50

4000g，25℃离心 10min，弃上清，留沉淀

试剂四	250	250

加入试剂四溶解沉淀后，室温静置 5min，取 200μL 转移至微量石英比色皿或 96 孔板中测定 415nm 处吸光值 A。对照管只要做一次即可。计算 ΔA＝A 测定-A 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_2O_2 含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 ΔA)。

2、血清（浆）中 H_2O_2 含量的计算：

H_2O_2 含量（μmol/mL）＝(ΔA-0.0006) ÷0.7488=1.34×(ΔA-0.0006)

3、细菌、细胞或动物组织中 H_2O_2 含量计算

（1）按照蛋白浓度计算

H_2O_2 含量(μmol/mg prot)=[(ΔA-0.0006) ÷0.7488×V1]÷(V1×Cpr)= 1.34×(ΔA-0.0006)÷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

H_2O_2 含量(μmol/g 鲜重)=[(ΔA-0.0006) ÷0.7488×V1]÷(W ×V1÷V2)= 1.34×(ΔA-0.0006)÷W

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

H_2O_2 含量(μmol/10^4)=[(ΔA-0.0006) ÷0.7488×V1]÷(500×V1÷V2)=0.0027×(ΔA-0.0006)

V1：加入反应体系中样本体积，0.25mL；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。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、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 ΔA)。

2、血清（浆）中 H_2O_2 含量的计算：

H_2O_2 含量（μmol/mL）＝(ΔA-0.0006)÷0.3744=2.67×(ΔA-0.0006)

3、细菌、细胞或组织中 H_2O_2 含量计算

（1）按照蛋白浓度计算

H_2O_2 含量(μmol/mg prot)=[(ΔA-0.0006) ÷0.3744×V1]÷(V1×Cpr)=2.67×(ΔA-0.0006)÷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

H_2O_2 含量(μmol/g 鲜重)=[(ΔA-0.0006) ÷0.3744×V1]÷(W ×V1÷V2)= 2.67×(ΔA-0.0006)÷W

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

H_2O_2 含量(μmol/10^4)=[(ΔA-0.0006) ÷0.3744×V1]÷(500×V1÷V2)= 0.0054×(ΔA-0.0006)

V1：加入反应体系中样本体积，0.25mL；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-2μmol/mL，吸光度 ΔA 线性范围为 0.03-1，若 ΔA 超过 1 则需要稀释，计算公式乘以相应稀释倍数。