

## 过氧化氢含量 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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

### 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。

### 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 6.5mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂四: 液体 30mL×1 瓶, 4℃ 保存;

### 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℃ 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  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

**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：**

**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， $\mu\text{mol/mL}$ ；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、细胞或动物组织中 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，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， $\mu\text{mol/mL}$ ；y 为 $\Delta A$ )。

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

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

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

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div Cpr$$

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

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 2.67 \times (\Delta A - 0.0006) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4) = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0054 \times (\Delta A - 0.0006)$$

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 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ -2 $\mu\text{mol/mL}$ ，吸光度 $\Delta A$  线性范围为 0.03-1，若 $\Delta A$  超过 1 则需要稀释，计算公式乘以相应稀释倍数。