

过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 测试盒说明书

(货号:A064-1-1 分光光度法 50管/48样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、测定原理:

过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 可以与钼酸作用生成一种络合物在 405nm 处测定其生成量可计算出 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。

## 二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存 (过饱和溶液, 如有结晶析出, 可 60℃ 水浴溶解后使用, 结晶较少时可直接取上清使用);

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准品: 贮备液 5mL×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前按贮备液: 蒸馏水=1:9 的体积比稀释, 充分混匀配成 163mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准品应用液, 现用现配。

## 三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (405nm) 及 96 孔板), 蒸馏水。

## 四、操作方法:

## 1、样本前处理:

血清(浆)等液体样本: 直接使用, 如有固体物存在, 可 8000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液测定。

细胞培养液: 吸取部分 8000 转/分离心 5 分钟, 取上清检测。

动物组织样本: 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 12000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

植物组织样本: 方法一是先将植物组织用 PBS 擦洗干净, 再用吸水纸吸干, 后剪碎放入研钵中, 液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 涡旋震荡 (或研磨仪研磨) 1 分钟, 12000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测; 方法二是在洗净并擦干水分后, 直接称重, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 冰水浴条件下机械匀浆, 12000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。(注: 一般水分含量较高的植物用方法二来处理, 相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

细胞样本: 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 10<sup>6</sup> 个, 越多越好) 加入 0.3mL 的生理盐水 (或者 PBS), 冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 12000 转/分离心 10 分钟, 取上清液 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

## 2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水 (mL)	0.1		
163mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 标准品应用液 (mL)		0.1	
样本 (mL)			0.1
试剂一 (mL)	1	1	1
试剂二 (mL)	1	1	1

涡旋混匀, 于波长 405nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管吸光值 A (或每管取 200μL 反应液加到 96 孔板中, 酶标仪 405nm 处读数)。

## 五、计算公式及举例:

## 1、计算公式:

$$\text{液体样本 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

$$\text{组织、细胞中 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/g 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

或

$$\text{组织中 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

## 以上公式中:

C<sub>标准</sub>: 标准液浓度 163mmol/L;

N: 样本测试前稀释倍数。

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, g/L。

W: 组织样本质量, g;

V<sub>样总</sub>: 样本前处理 (匀浆) 时, 加入的匀浆介质的总体积, L。

## 六、注意事项:

- 有些样本因其本身带有一定的颜色或者浊度, 需在操作表的基础上加测一个样本的对照管 (即 0.1mL 样本+2mL PBS (或蒸馏水), 混合后 405nm 处读数, 计算时 A<sub>测定</sub> 先减去 A<sub>对照</sub>, 再代入计算)。
- 样本取样量要做预试, 若取样量太大, 测定管吸光度大于 0.8 必须将样本进行稀释后再测。若取样量太小, 测定管吸光度小于 0.05 (或接近空白管吸光度), 则要将取样量增加 (此时标准管中的标准品应用液及空白管中的蒸馏水均要同样量增加, 但是标准品要作相应稀释后再增加量)。
- 细胞中过氧化氢含量较低, 建议细胞数越多越好 (最低不低于 10<sup>6</sup> 个)。