

过氧化氢 (H₂O₂) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1039

保存: 4℃避光保存 12 个月

规格: 48T/48S 96T/96S

检测范围: 12.5μM-800μM 灵敏度: 12.5μM

适用样本: 血清 (浆)、尿液、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

过氧化氢 (H₂O₂) 是生物体内最常见的活性氧分子, 是一种活性氧代谢的副产物, 主要由超氧化物歧化酶 (SOD) 和黄嘌呤氧化酶 (XO) 等催化产生, 由过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 等催化降解。过氧化氢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, H₂O₂ 可以直接或间接地氧化细胞内核酸, 蛋白质等生物大分子, 使细胞膜遭受损害, 从而加速细胞的衰老和解体; 另一方面, H₂O₂ 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。H₂O₂ 可以激活 NF-κB 等因子, 这些 H₂O₂ 相关的信号途径和哮喘、炎症性关节炎、动脉硬化以及神经退行性疾病等许多疾病相关。H₂O₂ 也和细胞凋亡、细胞增殖等密切相关。本试剂盒提供了一种简单易用的方法, 用于测量各种生物样本中 H₂O₂ 含量。原理是利用 H₂O₂ 氧化二价铁离子产生三价铁离子, 然后和 xylenol orange (二甲酚橙) 在特定的溶液中形成紫色的产物, 在 580nm 的吸光度与 H₂O₂ 浓度成正比, 从而测定 H₂O₂ 浓度。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃
显色物	2.5mL	5mL	4℃避光保存
H ₂ O ₂ 标准品 (1M)	0.1mL	0.1mL	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计 (能测 580nm 处的吸光度)

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

恒温箱、离心机、制冰机

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

10kDa 的超滤管 (用来去除蛋白)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

提取液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃保存。

显色物: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 整个实验过程中, 避光放置; 4℃避光保存。

H₂O₂ 标准品 (1M): 即用型; 使用前, 平衡到室温; 整个实验过程中, 避光放置; 4℃避光保存。

标准曲线设置:

先配制 2mM H₂O₂ 标准品: 取 2 μL H₂O₂ 标准品 (1M) 加 998 μL 提取液稀释;

再配制 800 μM H₂O₂ 标准品: 取 200 μL 2mM 的 H₂O₂ 标准品加入 300 μL 提取液稀释。

使用 800 μM H₂O₂ 标准品, 按照下表所示, 进一步稀释标准品。

	标准品体积	提取液体积 (μL)	标准品浓度 (μM)
Std. 1	400μL of 800 μM	0	800
Std. 2	200μL of Std. 1 (800 μM)	200	400
Std. 3	200μL of Std. 2 (400 μM)	200	200
Std. 4	200μL of Std. 3 (200 μM)	200	100
Std. 5	200μL of Std. 4 (100 μM)	200	50
Std. 6	200μL of Std. 5 (50 μM)	200	25
Std. 7	200μL of Std. 6 (25 μM)	200	12.5

注意：每次实验，请使用新配制标准品；配制好的标准品需要在 4h 之内使用；如果样本是细胞悬浮液，建议使用培养基配制 H₂O₂ 标准品。

样本制备

动物组织：用冷的 PBS 清洗组织，尽可能去除血液。吸干组织上的水分，称取 0.1g，加入 1mL 预冷的提取液，冰上匀浆。12,000g，4℃离心 10min，取上清液待测。

植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 预冷的提取液捣碎，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），12,000g，4℃离心 10min，取上清液待测。

细胞和细菌样本的制备：收集 5×10⁶ 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液冰上匀浆。12,000g，4℃离心 10min，取上清液待测。

血清、血浆、尿液（和其它生物学液体）：直接测定。

为了消除蛋白可能造成的干扰，可以对处理好的样本进行去除蛋白的处理。

去除蛋白的方式：使用 10kDa 的超滤管过滤后取滤液。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 6 个月。如下物质会干扰检测结果，样本中应避免存在：Ferric salts, iron salts, sucrose, glucose, ascorbic acid, SDS (>0.2%), sodium azide。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 580nm，可见分光光度计用去离子水调零。

2. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中按照如下方式加样：

试剂 (μL)	空白孔	标准孔	测定孔
提取液	60	0	0
标准品	0	60	0
样本	0	0	60
显色物	40	40	40

3. 充分混匀，37℃孵育 10min，读取 580nm 处的吸光值，记为 A_空、A_标、A_测，计算 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标}} - A_{\text{空}}$ 、 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测}} - A_{\text{空}}$ （空白孔只需测定 1 次）。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 0.5，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制 以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 样本 H₂O₂ 浓度计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 代入公式计算出 y (1μM=1nmol/mL)。

(1) 按样本鲜重计算 H₂O₂ 含量 (nmol/g 鲜重) = $y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = y \div W \times n$

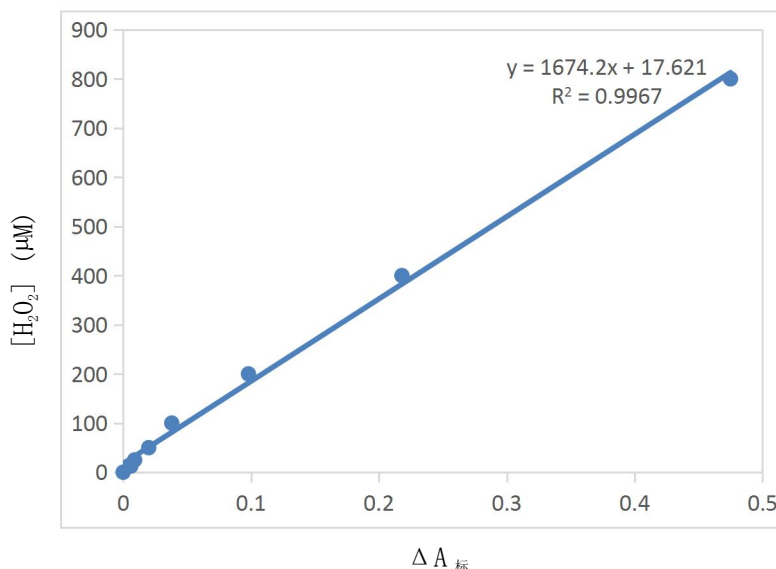
产品说明书

(2) 按样本体积计算 H_2O_2 含量 (nmol/mL) = $y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times n = y \times n$

(3) 按细胞或细菌数量计算 H_2O_2 含量 ($\text{nmol}/10^4 \text{ cell}$) = $y \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞或细菌数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = y \div 500 \times n$
 $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.06mL; W : 样本质量, 0.1g; $V_{\text{样总}}$: 样本制备时加入提取液体积, 1mL; n : 样本稀释倍数; 500: 细胞或细菌数量, 500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1036 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1037 过氧化氢酶 (CAT) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1038 过氧化物酶 (POD) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1041 黄嘌呤氧化酶 (XO) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1049 超氧阴离子检测试剂盒 (微量法)

PMK1061 超氧阴离子清除能力检测试剂盒 (微量法)



更多产品详情了解, 请关注公众号: