

过氧化氢 (H₂O₂) 检测试剂盒 (硫酸钛法/微量法)

货号: PMK1893

保存: 4°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/48S 96T/96S

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 H₂O₂ 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物, 在 415nm 有特征吸收。测定 415nm 处吸光度增加从而测定 H₂O₂ 浓度。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4°C
试剂二	5mL	10mL	4°C
试剂三	15mL	30mL	4°C
H ₂ O ₂ 标准品 (1M)	0.1mL	0.1mL	4°C

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计 (能测 415nm 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

浓盐酸、丙酮、去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

试剂一: 临用前 48T 加入 1.5mL 浓盐酸, 96T 加入 3mL 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, 务必提前准备)

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

2mM (μmol/mL) H₂O₂ 标准品: 取 2 μL H₂O₂ 标准品 (1M) 加 998 μL 丙酮稀释; 整个实验过程中, 避光放置; 4°C 避光保存。

注意: 每次实验, 请使用新配制的标准品; 配制好的标准品需要在 4h 之内使用。

样本制备

动植物组织: 称取 0.1g, 加入 1mL 预冷的丙酮, 冰上匀浆。转移至 EP 管中, 用丙酮定容至 1mL, 8,000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

产品说明书

细胞和细菌样本的制备：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌后弃上清，加入 1mL 预冷的丙酮，冰浴超声波破碎细胞和细菌 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），用丙酮定容至 1mL；8,000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）等液体样本：取 0.1mL 液体样本，加入 1mL 预冷的丙酮，充分混匀。8,000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

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。由于丙酮易挥发，必须先预冷再加，且需在冰上匀浆或研磨。丙酮会使蛋白变性，样本 H_2O_2 含量计算不宜使用按蛋白浓度计算的方式。

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 415nm，可见分光光度计用去离子水调零。
2. 将试剂一、二和三 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
3. 在 EP 管中按照如下方式加样：

试剂 (μ L)	测定	标准	空白
样本	250	0	0
标准品	0	250	0
丙酮	0	0	250
试剂一	25	25	25
试剂二	50	50	50
4,000g, 25℃ 离心 10min, 弃上清, 留沉淀（对于植物组织, 可用丙酮清洗 3-5 次洗去植物色素）			
试剂三	250	250	250

加入试剂三充分振荡溶解沉淀后，室温静置 5min，取 200 μ L 转移至微量石英比色皿或 96 孔板中测定 415nm 处吸光值 A。空白管只要做一次即可。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

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 或加入试剂三振荡以后有明显浑浊，样本可用丙酮进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 按样本鲜重计算

$$H_2O_2 \text{ 含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = 2 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W \times n$$

2. 按样本体积计算

$$H_2O_2 \text{ 含量} (\mu\text{mol/mL}) = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = 20 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times n$$

3. 按细胞或细菌数量计算

$$H_2O_2 \text{ 含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = 0.004 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times n$$

C_标: H_2O_2 标准品浓度, 2 $\mu\text{mol/mL}$; V_样: 测定时加入样本体积, 0.25mL; W: 样本质量, g; V_{样总}: 样本制备时加入提取液体积, 1mL; V_液: 样本制备时加入液体样本的体积; n: 样本稀释倍数; 500: 细胞或细菌数量, 500 万。

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，并请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 (WST-8 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)

更多产品详情了解，请关注公众号：

