过氧化氢（H_2O_2）含量检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1.使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2.正式检测前选取 2~3 个预期差异较大的样本上清进行预检测。

3.本试剂盒仅用于科研。

4.由于试剂一易挥发，试剂一必须先预冷再加，样本研磨时必须在冰上或冷冻研磨仪中进行。

5.本试剂盒中含易挥发试剂，请带一次性手套和口罩。

6.试剂一会使蛋白变性，若按蛋白浓度计算需另制备样品测蛋白浓度。

7.若测定管 OD 值大于 2，需使用试剂一将样本稀释直至测定管 OD 值小于 2，注意在计算公式中乘以相应的稀释倍数。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	**丙酮** 100 mL×1	4℃	**自备，使用前 4℃预冷**
试剂二	粉末×1	4℃	临用前加入 3 mL **浓盐酸（自备）**充分溶解备用。用不完的试剂 4℃保存；(溶解时间较长，约 30 min，可 40℃~60℃加热，**请根据实验安排，提前溶解该试剂）**
试剂三	8 mL×1	4℃	
试剂四	27 mL×1	4℃	

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、低温研磨仪/研钵、冰、丙酮、浓盐酸。

四、样品制备

1、血清、血浆、培养液等液体样品：按照每 100 μL 样品加入 900 μL 试剂一的比例充分混匀后，8000 g ，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

2、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 1 mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；用试剂一定容至 1 mL；8000 g，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

3、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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆；转移至 1.5 mL 离心管中，用试剂一定容至 1 mL，8000g ，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

五、测定步骤：

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 415 nm 处。

2. 将试剂二、三、四 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10 min 以上。

3.在 1.5 mL 离心管中依次加入（加入下列试剂时确保准确，降低误差）：

试剂名称	测定管	对照管
样本（μL）	250	-
试剂一（μL）	-	250
试剂二（μL）	25	25
试剂三（μL）	50	50
混匀，4000 g，常温离心 10 min，弃上清，留沉淀。（若样品色素含量较高时，可以试剂一清洗沉淀 2~3 次，直至沉淀为白色或浅黄色）		
试剂四（μL）	250	250
加入试剂四后充分震荡溶解沉淀后，室温静置 5 min，吸取 200 μL 于 96 孔板中测 415 nm 下吸光值 A。对照管只做 2~3 次即可。计算ΔA＝A 测定-A 对照。		

六、计算：

标准条件下测定的回归曲线，y = 0.4029x + 0.002（x 为标准品浓度，μmol/mL；y 为ΔA）。

1、血清（浆）中 H_2O_2 含量的计算：

H_2O_2 含量（μmol/mL）＝（ΔA-0.002）÷0.4029×10=24.82×（ΔA-0.0006）

2、细菌、细胞或组织中 H_2O_2 含量计算

（1）按照蛋白浓度计算（需要另外测定)

H_2O_2 含量（μmol/mg prot）=[（ΔA-0.002）÷0.4029×V1]÷（V1 ×Cpr）

=2.482×（ΔA-0.002）÷Cpr

（2）按照样本质量计算

H_2O_2 含量（μmol/g 鲜重）=[（ΔA-0.002）÷0.4029×V1]÷（W ×V1÷V2）

= 2.482×（ΔA-0.002）÷W

（3）按照细菌或细胞密度计算：

H_2O_2 含量（μmol/10^4）=[（ΔA-0.002）÷0.4029×V1]÷（V1÷V2×细胞数量（万个））

=2.482×（ΔA-0.0006）÷细胞数量 （万个）

V1：加入反应体系中样本体积，0.25 mL；V2：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；10：血清、血浆、培养液等液体稀释倍数。

八、产品简介

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。