

过氧化氢 (H₂O₂) 测试盒

(货号: BC043 分光光度法 50 管/48 样)

一、测定原理:

过氧化氢 H₂O₂ 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 H₂O₂ 的量。

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°C 保存;

试剂二: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存 (过饱和溶液, 如有结晶析出, 可 60°C 水浴溶解后使用);

H₂O₂ 标准品: 贮备液 5mL×1 瓶, 4°C 保存; 临用前按 **H₂O₂ 标准贮备液: 蒸馏水=1:9** 的比例配成 **163mmol/L H₂O₂ 标准品应用液**, 现用现配。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 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。

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 BC016) 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 10⁶ 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 BC016) 待测。

2、操作表:

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

混匀,于 405nm 处,1cm 光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值 A (或每

管取 200 μ L 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:

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

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

或

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

$C_{\text{标准}}$: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, gprot/L (prot 指蛋白)。

W : 组织样本质量, g;

$V_{\text{样总}}$: 样本前处理 (匀浆) 时, 加入的匀浆介质的体积, L。

2、计算举例:

例 1: 直接取牛血清原液 0.1mL 按照操作表进行测定, 测得测定管的吸光度为 0.099, 空白管吸光度为 0.006, 标准管吸光度为 0.341, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{牛血清中H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/L)} &= \frac{0.099 - 0.006}{0.341 - 0.006} \times 163 \\ &= 45.251\text{mmol/L} \end{aligned}$$

例 2: 取 10%小鼠肺匀浆 0.1mL 按操作表进行检测, 测得测定管吸光度为 0.065, 空白管吸光度为 0.008, 标准管吸光度为 0.346 同时测得 10%小鼠肺匀浆蛋白浓度为 6.284gprot/L 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{组织中H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/gprot)} &= \frac{0.065 - 0.008}{0.346 - 0.008} \times 163 \div 6.284 \\ &= 4.028\text{mmol/gprot} \end{aligned}$$

六、注意事项:

- 1、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 $A_{\text{测定}}$ 先减去 $A_{\text{对照}}$, 再代入计算)。
- 2、样本取样量要做预试, 若取样量太大, 吸光度大于 0.8 必须将样本进行稀释。若取样量太小, 吸光度小于 0.05, 则要将取样量增加。(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)
- 3、细胞中过氧化氢较低, 建议细胞数越多越好 (最低不低于 10^6 个)。