

过氧化氢含量检测试剂盒(荧光法)

规格：微量法 96样

编号：JLC_K14856

检测原理：荧光法/比色法

注意

1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；

测定意义

H₂O₂ 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。H₂O₂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，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H₂O₂也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

测定原理

该测定试剂盒使用 Amplex™ Red 试剂 (10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪) 检测过氧化氢 (H₂O₂)。Amplex™ Red 试剂与辣根过氧化物酶 (HRP) 配合使用以检测从生物样品 (包括细胞) 中释放或在酶偶联反应中生成的 H₂O₂。

需自备的仪器和用品

天平、离心机、荧光酶标仪/酶标仪、移液器、涡旋混匀仪、黑色96孔板/酶标板、匀浆器。

试剂组成和配制

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体100mL	X1	4℃	
试剂一	液体200uL	x1	4℃,避光	取10 uL试剂一和990 uL提取液混匀即为试剂一A
试剂二	粉剂	x1	-20℃,避光	临用前加入6mL提取液溶解，分装冻存，避免反复冻融。
试剂三	粉剂	X1	-20℃,避光	临用前加入78μL试剂四(预先恢复至室温)溶解，现用

				现配，不可保存。
试剂四	液体	x1	4°C，避光	

样品处理

细菌或培养细胞：按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为500：1的比例，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔7s，重复30次）；10000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

组织样本：称取约0.1g样本，加入1mL提取液，冰浴匀浆，10000g，4°C离心10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）等液体样品：用提取液稀释或直接进行检测。

实验准备

(1) 荧光酶标仪预热30min以上，激发波长为540nm，发射波长为590nm。

或者酶标仪预热30min以上，波长设置560nm。

(2) 工作液按照试剂三：试剂二：提取液=1：2：97的比例依据用量配置。

(3) 取5 μ L试剂一加入995 μ L提取液混匀即得100 μ mol/L的H₂O₂母液，把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0，2，4，6，8，10 μ mol/L。

测定操作表

	空白管	测定管	标准管
样本（ μ L）	-	50	-
标准品（ μ L）	-	-	50
提取液（ μ L）	50	-	-
工作液（ μ L）	50	50	50

混匀，室温避光孵育30min，荧光光度Ex/Em=540/590nm测定（或者酶标仪560nm测定吸光值）。 $\Delta A_{测定} = 测定管 - 空白管$ ， $\Delta A_{标准} = 标准管 - 空白管$ 。

注意：限定测定管荧光强度在200-2000之间，如果荧光强度大于2000可用提取液稀释，如果荧光强度小于200可以增加样本量。

建立标准曲线

以H₂O₂的浓度（ μ mol/L）为横坐标， ΔA 为纵坐标建立标准曲线得到 $y = ax + b$ 。

过氧化氢含量计算

(1) 按照样本质量计算

$$\text{过氧化氢含量}(\mu\text{mol/g}) = (\Delta A - b) \div a \times V_{\text{提}} \div W$$

(2) 按照细菌/细胞数量计算

$$\text{过氧化氢含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - b) \div a \times V_{\text{提}} \div 500$$

(3) 按照液体体积计算

$$\text{过氧化氢含量}(\mu\text{mol/L}) = (\Delta A - b) \div a$$

V提：样本提取体积，0.001L

500：细胞数量，万

W：样本重量，g

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例

。