过氧化氢（H_2O_2）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1039

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

检测范围：3.13μM-200μM　　**灵敏度：**3.13μM

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（H_2O_2）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，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，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。H_2O_2可以激活 NF-κB 等因子，这些H_2O_2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。H_2O_2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H_2O_2含量。原理是利用H_2O_2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H_2O_2浓度成正比，从而测定H_2O_2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_2O_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。
H_2O_2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 H_2O_2标准品：取 2μL H_2O_2标准品(1M)加 998μL 提取液稀释；
再配制 200μM H_2O_2标准品：取 50μL 2mM 的H_2O_2标准品加入 450μL 提取液稀释。
使用 200μM H_2O_2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 200μM	0	200
Std.2	200μL of Std.1 (200μM)	200	100
Std.3	200μL of Std.2 (100μM)	200	50
Std.4	200μL of Std.3 (50μM)	200	25
Std.5	200μL of Std.4 (25μM)	200	12.5
Std.6	200μL of Std.5 (12.5μM)	200	6.25
Std.7	200μL of Std.6 (6.25μM)	200	3.13

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；如果样本是细胞悬浮液，建议使用培养基配制 H_2O_2 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 5×10^6 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 $\Delta A_{标}=A_{标}-A_{空}$、$\Delta A_{测}=A_{测}-A_{空}$（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 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 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，$\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。
2. 样本 H_2O_2 浓度计算

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

（1）按样本鲜重计算 H_2O_2 含量(nmol/g 鲜重)$=y\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n=y\div W\times n$

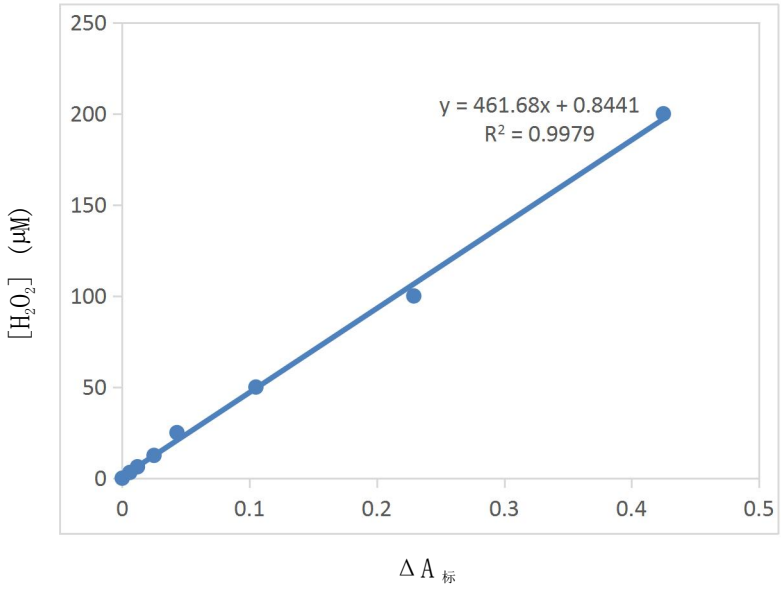
（2）按样本体积计算 H_2O_2 含量(nmol/mL)=y×$V_{样}$÷$V_{样}$×n=y×n

（3）按细胞或细菌数量计算 H_2O_2 含量(nmol/10^4 cell)=y×$V_{样}$÷(细胞或细菌数量×$V_{样}$÷$V_{样总}$)×n=y÷500×n

$V_{样}$：加入样本体积，0.06mL；W：样本质量，0.1g；$V_{样总}$：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（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：