



过氧化氢含量检测试剂盒荧光法

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法/比色法

编号：TW56845

注意

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°C,避光	取 10μL 试剂一和 990 μL 提取液混匀即为试剂一 A
试剂二	粉剂	x1	-20°C,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°C,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 5μL 试剂一加入 995μL 提取液混匀即得 100μmol/L 的 H_2O_2 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, 10μmol/L。



测定操作表

	空白管	测定管	标准管
样本(μL)	-	50	-
标准品(μL)	-	-	50
提取液(μL)	50	-	-
工作液	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）。 ΔA 测定=测定管-空白管， ΔA 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 可以增加样本浓度。

建立标准曲线

以 H_2O_2 的浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 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最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。