

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

过氧化氢测定试剂盒

Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Assay Kit

产品货号: BC00028

产品规格: 150T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	过氧化氢测定试剂盒
产品英文名称	Hydrogen Peroxide (H2O2) Assay Kit
检测方法	Colorimetric
样品类型	组织、细胞、血清、血浆、尿液
检测类型	Quantitative
检测仪器及波长	酶标仪（240 nm、（540-570 nm，最佳检测波长 560nm））
检测范围	1-100μM
灵敏度	0.7809μM

产品简介

过氧化氢是一种活性氧代谢的副产物，在许多氧化应激反应中过氧化氢都是一种关键的调节因子。过氧化氢可以激活 NF-κB 等因子，这些过氧化氢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。过氧化氢也和细胞凋亡、细胞增殖等密切相关。

产品特点

★本试剂盒方便快捷，通常 10-20 个样品可以在 40-60 分钟内测定完毕。

检测原理

本试剂盒通过过氧化氢氧化二价铁离子产生三价铁离子，然后和 xlenol orange 在特定的溶液中形成紫色的产物，从而实现对过氧化氢浓度的测定。本试剂盒经过改良配方，可以检测低至 1 微摩尔/升的过氧化氢。

产品组分

编号	产品名称	包装规格 (150T)	保存方式
试剂一	显色剂	15ml	-20℃
试剂二	铁试剂	粉剂	-20℃
试剂三	过氧化氢标准溶液(1M)	1ml	-20℃, 需避光保存。
试剂四	过氧化氢检测裂解液	50ml	-20℃

耗材一	96 孔酶标板	1 板	RT
耗材二	96 孔覆膜	2 张	RT

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 6 个月。

实验前准备

• 样品处理

1. 细胞或组织样品的制备

对于培养的细胞，先收集细胞到离心管内，弃上清，按照每 100 万细胞加入 100-200 微升过氧化氢检测裂解液的比例加入裂解液，随后充分匀浆以破碎并裂解细胞。4℃ 约 12000g 离心 3-5 分钟，取上清，用于后续测定。组织样品按照每 5-10mg 组织加入 100-200 微升裂解液的比例进行匀浆。 4℃ 约 12000g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续测定。以上所有操作均需在 4℃ 或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不立即测定，可以-20℃ 冻存。

2. 培养细胞上清液样品的制备

培养细胞的上清液可以直接用于后续的测定。

3. 血清、血浆或尿液样品的准备

配制 50mM 磷酸缓冲液， pH 为 6.0。用 pH 为 6.0 的 50mM 磷酸缓冲液把样品稀释 50 倍。例如 4 微升样品稀释到 196 微升 pH 为 6.0 的 50mM 磷酸缓冲液中。稀释后即可用于后续的测定。

• 试剂盒的准备工作

1. 将所有试剂取出，恢复至室温使用。

2. 铁试剂的配制（需自备 0.01mol/l 的硫酸溶液）：取一支试剂二加入 15ml 0.01mol/l 的硫酸溶液充分混匀（建议先向试剂二管中加入 1ml 硫酸溶液充分溶解后转移至 15ml 离心管中，再补加 14ml 硫酸溶液，充分混匀即可）。

3. 显色工作液的配制：将上述配制好的铁试剂与显色剂按照体积比=1:1，充分混匀，现配现用。

操作流程

1. 标准曲线测定的准备

(1) 过氧化氢标准品的校准

由于过氧化氢不是非常稳定，使用前需自行测定过氧化氢的实际浓度以进行校准。把浓度约为 1M 的过氧化氢用水稀释 100 倍，使过氧化氢的浓度约为 10mM，测定 A240。

A240 的测定可采用如下的任一方法：

- a. 普通紫外分光光度计法：使用含比色皿架的紫外分光光度计、NanoDrop 2000C、NanoDrop One^c、QuickDrop 等仪器，配套石英比色皿。确定比色皿光程(path length)，一般为 1cm。用比色皿检测的过氧化氢浓度最接近实际浓度。
- b. 微量紫外分光光度计法：如 NanoDrop 2000、NanoDrop One、QuickDrop、含超微量检测板 μ Drop Plate 的 Varioskan 等仪器。确定光程：对于 NanoDrop 2000、NanoDrop One 等，需要取消“自动化光程”，此时光程一般为 0.1cm；Varioskan 的超微量检测板 μ Drop Plate 的光程一般为 0.05cm。具体的微量紫外分光光度计的光程请参考仪器参数。
- c. 96 孔紫外酶标仪法(须能检测 240nm 波长)：根据 96 孔板的参数确定光程，一般 200 微升样品的光程为 0.552cm (样品体积除以 96 孔单孔孔内横截面面积)。一般建议使用专用的 96 孔紫外检测板(如 96 孔 UV 板)，如果没有紫外检测板，也可使用一般的 96 孔板，但由于为非紫外检测专用板，会有非常高的紫外吸收信号，所以需要设置含等量双蒸水的孔作为空白对照(一般 200 μ l 水在该类 96 孔板的 A240 在 3.8 左右)，计算时须减去该空白对照。在使用非紫外检测专用板的情况下，由于 96 孔酶标仪在 240nm 的检测上限有限，建议将过氧化氢稀释至约 10mM 左右后再进行浓度测定。

注意：以上所有方法都需要设置等量双蒸水作为空白对照，并在计算时减去该空白对照。

浓度计算公式： $c=A/(\epsilon \times b)$ 。其中： c 为样品浓度(单位为 mol/L 或 M)； A 为吸光值； ϵ 为波长依赖的摩尔消光系数(单位为 $L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 或 $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)，过氧化氢的摩尔消光系数为 $43.6 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ； b =光程(单位为 cm)。

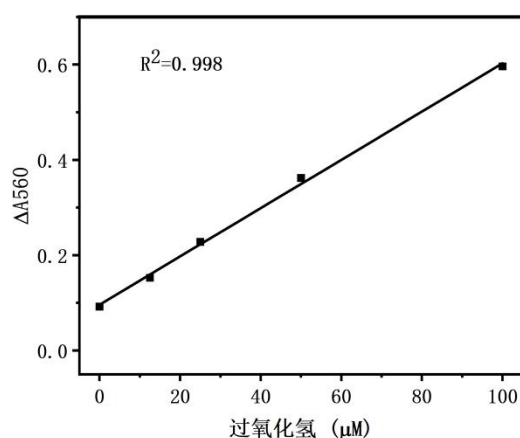
因此：过氧化氢浓度(M)= $A_{240}/(43.6 \times b)$ ；即：过氧化氢浓度(mM)= $22.94 \times A_{240}/b$

从而计算出本试剂盒提供的过氧化氢的实际浓度，并根据实际测定出来的浓度进行后续的标准曲线的设置。

示例：将本试剂盒提供的约为 1M 的过氧化氢用双蒸水稀释 100 倍后，用 96 孔酶标仪及一般的 96 孔板进行检测，每孔 200 微升，每组 3 个平行。双蒸水对照组的平均 A240 为 3.750，过氧化氢样品组的平均 A240 为 3.974，差值为 0.224，200 微升样品的光程为 0.552cm。代入公式，过氧化氢浓度(mM)= $22.94 \times 0.224 / 0.552 = 9.31$ ，则实际本试剂盒提供的过氧化氢浓度为 0.931M。

(2) 标准曲线的设置

样品在什么溶液中稀释，标准品也需用什么溶液稀释，这样可以减小误差。例如对于细胞样品，标准品宜用过氧化氢检测裂解液稀释，对于培养细胞的上清液样品，标准品宜用相应的细胞培养液稀释。标准溶液可以用对半稀释法稀释成 100、50、25、12.5、6.25 微摩尔/升，初次测定后知道样品的浓度范围后也可以对标准品在样品浓度范围附近密集测定。下图展示了本试剂盒测定标准曲线的典型图。



2 过氧化氢浓度的测定

- (1) 把过氧化氢检测试剂在冰上或冰水浴上融解。
- (2) 在检测孔或检测管内加入 50 微升样品或标准品。
- (3) 在每个孔内加入 100 微升显色工作液。
- (4) 轻轻振荡或敲打混匀，室温(15-30°C)放置 30 分钟。然后立即测定 A560。如测 A560 有困难，波长可以选择 540-570nm。

操作表如下：

	标准管（孔）	测定管（孔）
不同浓度的标准品(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
显色工作液(μL)	100	100
轻轻振荡或敲打混匀，室温(15-30℃)放置 30 分钟。然后立即测定 A560。如测 A560 有困难，波长可以选择 540-570nm。		

注意：如果样品中过氧化氢的浓度过高，可以适当稀释后再测定。如果样品中过氧化氢的浓度过低，可以把样品的体积改为使用 100 微升，同时标准品也使用 100 微升，而显色工作液仍然使用 100 微升。这样可以提高检测的灵敏度，但缺点是样品需要消耗 100 微升。

结果计算

根据标准曲线计算出样品中过氧化氢的浓度。

注意事项

- 1. 一些干扰氧化还原的试剂或在酸性条件下呈紫色或接近的试剂会对过氧化氢的检测产生干扰，需尽量避免。
- 2. 如果样品中含有外加的较高浓度的铁盐，会干扰测定。但普通培养基、血清等样品中含有的微量的铁盐不会干扰测定。
- 3. 测定时需可以测定 A560 的酶标仪一台(测 540-570nm 也可以)或可以测定微量样品的分光光度计一台。
- 4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。