

## 过氧化氢含量试剂盒荧光法

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法/比色法

编号：ml300884

**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：

$H_2O_2$  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。 $H_2O_2$  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，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  $H_2O_2$  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 ( $H_2O_2$ )。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  $H_2O_2$ 。

### 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°C	
试剂一	液体 200μL	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 5 $\mu$ L 试剂一加入 995 $\mu$ L 提取液混匀即得 100 $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $\mu$ mol/L。

### 测定操作表：

	空白管	测定管	标准管
样本 ( $\mu$ L)	-	50	-
标准品 ( $\mu$ L)	-	-	50
提取液 ( $\mu$ L)	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)。 $\Delta A$  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 可以增加样本浓度。

### 建立标准曲线

以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度 ( $\mu$ mol/L) 为横坐标,  $\Delta A$  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。