# CheKine™ 过氧化氢（$H_2O_2$）含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1041　　规格: 96 T/96 S　480 T/480 S　　批号：见产品标签

| | | | |
|---|---|---|---|
| ≠ | **检测范围：**1-100 μM | | **灵敏度：**1 μM |
| | **适用样本：**动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）、尿液 | | |
| | **保质期：**-20℃，避光保存 12 个月 | | |

## 01 背景与原理

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 SOD 和 XOD 等催化产生，由 CAT 和 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，过氧化氢也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。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。

本试剂盒检测原理是利用过氧化氢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 580 nm 的 OD 值与过氧化氢浓度成正比，从而实现对过氧化氢浓度的测定。

## 02 包装清单

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存要求 |
|---|---|---|---|
| | 96 T | 480 T | |
| **Reaction Buffer** | 5 mL | 25 mL | -20℃，避光保存 |
| **$H_2O_2$ Standard (1 M)** | 0.1 mL | 0.1 mL | -20℃，避光保存 |
| **Assay Buffer (10×)** | 13 mL | 65 mL | 4℃ |

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

## 03 自备仪器与试剂

| 自备资源类型 | 资源名称 | 备注 |
| --- | --- | --- |
| **仪器** | 酶标仪 | 能测 580 nm 处的吸光度 |
| **耗材** | 96 孔酶标板/超滤管 | 普通透明板/10 kDa 超滤管 |
| **试剂** | PBS（pH 7.4）/去离子水/30% $ZnSO_4$ 溶液 | 清洗细胞（菌）用/试剂配制用/去除蛋白 |
| **其他** | 匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头 | 检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率 |

## 04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

## 05 实验流程

### 05-1 试剂准备

#### 05-1-1 试剂准备

| 试剂名称 | 试剂准备 | 注意事项 |
| --- | --- | --- |
| **Reaction Buffer** | 即用型；使用前平衡到室温 | 实验过程中避光放置；分装后-20℃避光保存 |
| **$H_2O_2$ Standard (1M)** | 即用型；使用前平衡到室温 | 实验过程中避光放置；分装后-20℃避光保存 |
| **Assay Buffer (1×)** | 使用前平衡到室温。Assay Buffer (10×)用去离子水 1:10 稀释后作为工作液。 | 稀释后可在 4℃保存至少 2 个月，用来稀释 $H_2O_2$ 标准品和样本 |

#### 05-1-2 标准品配制

标准曲线设置：先配制 2 mM $H_2O_2$ Standard：2 μL 1 M 的 $H_2O_2$ Standard 用 998 μL 的 Assay Buffer (1×)稀释；再配制 100 μM $H_2O_2$ Standard：50 μL 2 mM 的 $H_2O_2$ Standard 用 950 μL 的 Assay Buffer (1×)稀释。100 μM $H_2O_2$ Standard，按照下表所示，进一步稀释标准品。**每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4 h 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。**

| Standard 工作液 | 100 μM Standard（μL） | Assay Buffer (1×)（μL） | 浓度（μM） |
|---|---|---|---|
| **1** | 200 | 0 | 100 |
| **2** | 100 | 100 | 50 |
| **3** | 40 | 160 | 20 |
| **4** | 20 | 180 | 10 |
| **5** | 10 | 190 | 5 |
| **6** | 4 | 196 | 2 |
| **7** | 2 | 198 | 1 |
| 空白 | 0 | 200 | 0 |

## 05-2 样本制备

**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 1 个月。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻，但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期；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。该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1500 试剂盒。**

- **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 0.1 g，加入 1 mL 预冷的 Assay Buffer (1×)，将样本冰浴匀浆。10000 g，4℃离心 5 min，取上清液置冰上待测。
- **植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 预冷的 Assay Buffer (1×)捣碎，冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），10000 g，4℃离心 5 min，取上清液置冰上待测。
- **细胞（菌）**：收集 5×$10^6$ 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌后，加入 1 mL 预冷的 Assay Buffer (1×)冰浴匀浆或冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次）。10000 g，4℃离心 5 min，取上清液置冰上待测。
- **血浆、血清和尿液（和其他生物体液）**：去除蛋白后，取上清。去除蛋白的方式：可使用 10 kDa 的超滤管过滤后取滤液或是将样本：30% $ZnSO_4$ 溶液=20:1 进行混合后涡旋，再 10000 g 室温离心 5 min，取上清。

## 05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 580 nm。
2. **检测体系配制**：

| 试剂 | 标准孔（μL） | 测定孔（μL） |
|---|---|---|
| **不同浓度标准品** | 60 | 0 |
| **样本** | 0 | 60 |
| **Reaction Buffer** | 40 | 40 |

3. **反应体系充分混匀后在 37℃孵育 10 min**。
4. **吸光度检测**：在 580 nm 处读取吸光度值，分别标记为 $A_{空白}$、$A_{标准}$和 $A_{测定}$。

## 06 结果计算

### 06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]进入“**技术中心**”查找“**在线计算器**”**工具**。

### 06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

**1. 数据处理**

计算$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$，$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$。

**2. 标准曲线绘制**

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值(μM)。

**3. 样本 $H_2O_2$ 浓度计算**

- 按样本质量计算

$H_2O_2$ 含量(nmol/g 鲜重)=$y\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n=$**$y\div W\times n$**

- 按细胞或细菌数量计算:

$H_2O_2$ 含量(nmol/$10^4$)=$y\times V_{样}\div(500\times V_{样}\div V_{样总})\times n=$**$y\div 500\times n$**

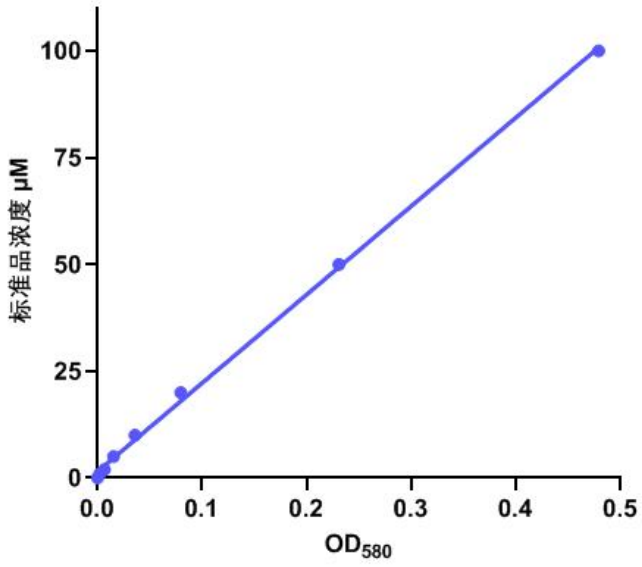
- 按液体体积计算

$H_2O_2$ 含量(nmol/mL)=$y\times V_{样}\div V_{样}\times n=$**$y\times n$**

nmol：1 μM=1 nmol/mL；$V_{样}$：加入样本体积；$V_{样总}$：加入 Assay Buffer (1×)体积，1 mL；n：样本稀释倍数；W：样本质量，g；500：细胞或细菌数量，$5\times10^6$，以 $10^4$ 为单位。

## 07 结果展示

典型标准曲线：$y=207.21x+1.4921$, $R^2=0.9988$



示例-1：取 0.1 g 玉米组织，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}=0.278-0.048=0.230$，代入标准曲线，计算 y=49.15。按样本质量计算得：$H_2O_2$ 含量(nmol/g)=$y\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n=y\div W\times n=491.5$ nmol/g。

## 08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

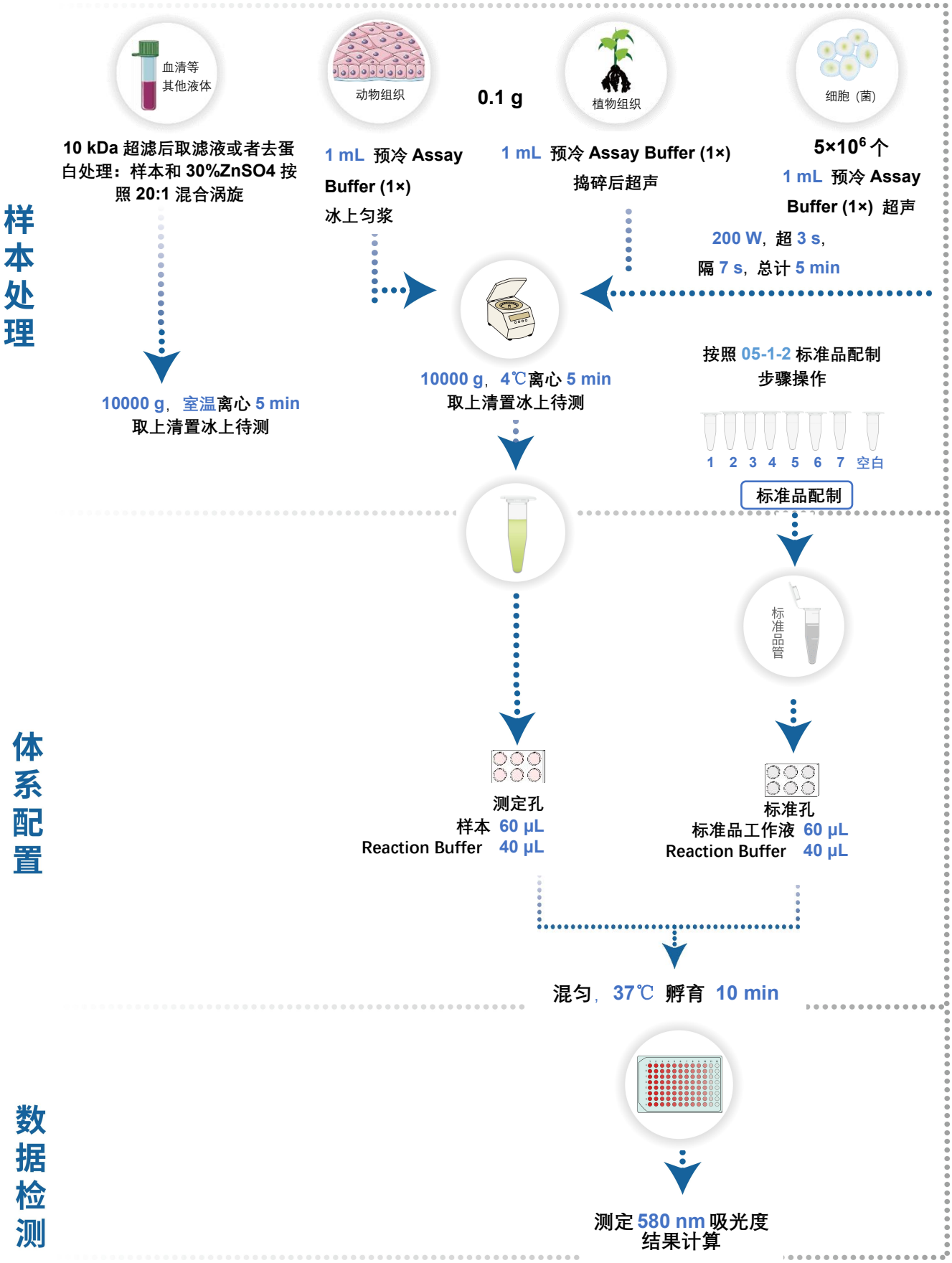
如果样本$\Delta A_{测定}$ > 浓度为 100 μM 标准品的$\Delta A_{标准}$，则说明样本 $H_2O_2$ 含量太高，需用 Assay Buffer (1×)适当稀释（计算公式中乘以相应稀释倍数）。如果样本的$\Delta A_{测定}$ < 0.005，可提高样本量。

## 09 相关产品

| 货号 | 试剂盒名称 |
|---|---|
| **KTB1030** | CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1040** | CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性分析试剂盒（微量法） |
| **KTB1150** | CheKine™ 过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1070** | CheKine™ 黄嘌呤氧化酶(XO)活性分析试剂盒（微量法） |
| **KTB1080** | CheKine™ 超氧阴离子清除能力检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1091** | CheKine™ 羟自由基清除能力检测试剂盒（微量法） |

# CheKine™ 过氧化氢（$H_2O_2$）含量检测流程示意图

## （Abbkine 货号：KTB1041）




V1.0