

## 过氧化氢含量 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-YH001 分光法 48 样 有效期: 9 个月)

### 一、指标介绍:

过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 是重要的活性氧之一, 不仅具有损伤生物大分子、产生细胞毒害的能力, 而且还可作为信号分子, 在生物和非生物胁迫应激、细胞程序性死亡以及生长发育调控过程中起重要作用。它与钛盐反应生成过氧化物—钛复合物黄色沉淀, 可被浓硫酸溶解后, 在波长 415nm 波长下有最大吸收峰。其颜色深浅与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度成线性关系。

### 二、试剂盒的组分与配制:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项  |
|------|-------------|----------|---|
| 试剂一  | 粉剂 1 瓶      | 4°C 保存   | 1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 4mL 水, 涡旋振荡充分溶解, 若有沉淀, 可静置 10min (或更长时间) 或转移至 2mLEP 管中 5000rpm 室温离心 5min, 取上清液用于检测。<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 液体 5mL×1 瓶  | 4°C 避光保存 |   |
| 试剂三  | 液体 35mL×1 瓶 | 4°C 保存   |   |
| 标准品  | 液体 1 支      | 4°C 避光保存 | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。   |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、丙酮、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 预冷丙酮, 进行冰浴匀浆, 转移至 EP 管中, 用丙酮定容至 1mL, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):预冷丙酮(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 预冷丙酮, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 用丙酮定容至 1mL, 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10<sup>4</sup>):预冷丙酮(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

##### ③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 2、检测步骤

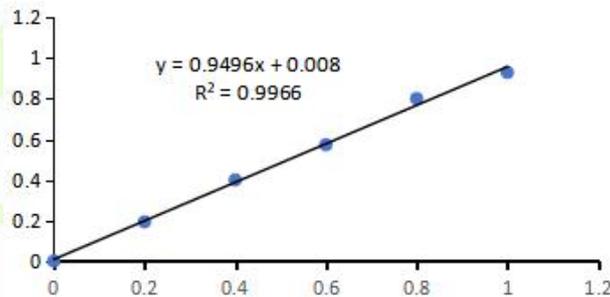
- ① 可见分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 415nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：
  - ，调节波长至 415nm，蒸馏水调零。
  - ② 在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分 (μL)  | 测定管 | 空白管 (只做一次) |
|--|-----|------------|
| 样本   | 500 |            |
| 丙酮   |     | 500        |
| 试剂一  | 50  | 50         |
| 试剂二  | 100 | 100        |
| 充分混匀，12000rpm，25°C离心 10min，弃上清，留沉淀   |     |            |
| 试剂三  | 700 | 700        |
| 加入试剂三溶解沉淀后混匀(若有沉淀产生，12000rpm 离心 2 分钟即可)。<br>转移全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，<br>于 415nm 处读取吸光值 A。ΔA = A 测定-A 空白。 |     |            |

- 【注】：**1.色素含量高的样本在加入试剂二并离心后，若上清液出现悬浮黑色物质，此时须将离心得到的沉淀，再用 500μL 预冷丙酮混匀并离心（重复 2 次），此时得到的沉淀再加入 700μL 试剂三测定。
2. ΔA 线性范围为 0.03-1.0，若 ΔA 超过 1.0 则需用丙酮稀释，计算公式乘以相应稀释倍数 D。  
若 ΔA 值较低可增加样本取样质量 W(如增加至 0.2g)或增加样本加样体积 V1(如由 500μL 增至 700μL，其他试剂不变)，则改变后的 W 和 V1 代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.9496x + 0.008$ ：x 为标准品摩尔质量 (μmol)，y 为 ΔA。



- 2、按照样本质量计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重})=[(\Delta\text{A}-0.008) \div 0.9496] \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} = 2.1 \times (\Delta\text{A}-0.008) \div \text{W} \times \text{D}$$

- 3、按照蛋白浓度计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mg Prot})=[(\Delta\text{A}-0.008) \div 0.9496] \div (\text{Cpr} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} = 2.1 \times (\Delta\text{A}-0.008) \div \text{Cpr} \times \text{D}$$

- 4、按液体体积计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mL})=[(\Delta\text{A}-0.008) \div 0.9496] \div \text{V1} \times \text{D} = 2.1 \times (\Delta\text{A}-0.008) \times \text{D}$$

- 5、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta\text{A}-0.008) \div 0.9496] \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times 10^3 \times \text{D} \\ &= 4.21 \times (\Delta\text{A}+0.0329) \times \text{D} \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;      V1---加入反应体系中样本体积, 0.5mL;  
W---样本质量, g;                      D---稀释倍数, 未稀释即为 1。  
500---细菌或细胞总数, 万。  
Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算;
- 2 制备标准品母液 (20  $\mu\text{mol/mL}$ ): 临用前取出 10 $\mu\text{L}$  标准品溶解在 4.99mL 丙酮中, 充分混匀;
- 3 将母液用丙酮稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

| 吸取标准品母液 100 $\mu\text{L}$ , 加入 900 $\mu\text{L}$ 丙酮, 混匀得到 2 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓度<br>$\mu\text{mol/mL}$   | 0   | 0.4 | 0.8 | 1.2 | 1.6 | 2   |
| 标品稀释液<br>uL  | 0   | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 丙酮 uL  | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 0   |
| 各标准管混匀待用。  |     |     |     |     |     |     |

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

| 试剂组分 ( $\mu\text{L}$ )  | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|---|-----|--------------|
| 标品  | 500 |              |
| 丙酮  |     | 500          |
| 试剂一   | 50  | 50           |
| 试剂二   | 100 | 100          |
| 充分混匀, 12000rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 弃上清, 留沉淀  |     |              |
| 试剂三   | 700 | 700          |
| 加入试剂三溶解沉淀后混匀, 若有沉淀产生, 12000rpm 离心 2 分钟即可。<br>转移全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 415nm 处读取吸光值 A。<br>$\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |              |