

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

（货号:ADS-W-YH001 微板法 96 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，而且还可以作为信号分子，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℃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℃避光保存 |                                                                                                                                      |
| 试剂三  | 液体 23mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                                                                                      |
| 标准品  | 液体 1 支      | 4℃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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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 丙酮，进行冰浴匀浆，转移至 EP 管中，用丙酮定容至 1mL，12000rpm，4℃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℃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。

#### 2、检测步骤

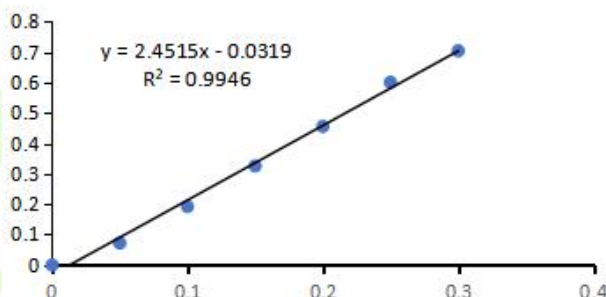
- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 415nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分 (μL)                                                                                             | 测定管 | 空白管 (只做一次) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------|
| 样本                                                                                                    | 250 |            |
| 丙酮                                                                                                    |     | 250        |
| 试剂一                                                                                                   | 25  | 25         |
| 试剂二                                                                                                   | 50  | 50         |
| 充分混匀，12000rpm，25℃离心 10min，弃上清，留沉淀                                                                     |     |            |
| 试剂三                                                                                                   | 230 | 230        |
| 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>取 200μL 上清液转移至 96 孔板中，<br>于 415nm 处读取吸光值 A。ΔA = A 测定-A 空白。 |     |            |

- 【注】：1. ΔA 线性范围为 0.03-1.0，若 ΔA 超过 1.0 则样本需要用丙酮稀释，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 250μL 增至 500μL，其他试剂不变)，则改变后的 W 和 V1 代入公式重新计算。
2. 对于色素含量高的样本可能在加入试剂二后出现悬浮黑色物质，可减少样本量（如减至 50μL，则另加 200μL 丙酮，总共 250μL），或在加入试剂三前的沉淀中加入 250μL 丙酮混匀离心除去色素（重复 2 次）。

## 五、结果计算：

- 1、标准曲线方程：y = 2.4515x - 0.0319：x 为标准品摩尔质量，μmol；y 为 ΔA。



- 2、按照样本质量计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0319) \div 2.4515] \div (W \times V1 \div V) \times D=1.63 \times (\Delta A+0.0319) \div W \times D$$

- 3、按照蛋白浓度计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mg Prot})=[(\Delta A+0.0319) \div 2.4515] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D=1.63 \times (\Delta A+0.0319) \div Cpr \times D$$

- 4、按液体体积计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mL})=[(\Delta A+0.0319) \div 2.4515] \div V1 \times D=1.63 \times (\Delta A+0.0319) \times D$$

- 5、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &=[(\Delta A+0.0319) \div 2.4515] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D \\ &=3.26 \times (\Delta A+0.0319) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;      V1---加入反应体系中样本体积, 0.25mL;  
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, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu\text{mol/mL}$ 。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 1.9ml 丙酮, 混匀得到 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu\text{mol/mL}$                                                     | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 标品稀释液<br>$\mu\text{L}$                                                         | 0   | 50  | 100 | 150 | 200 | 250 |
| 丙酮 $\mu\text{L}$                                                               | 250 | 200 | 150 | 100 | 50  | 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                                                                                                                                 | 250 |              |
| 丙酮                                                                                                                                 |     | 250          |
| 试剂一                                                                                                                                | 25  | 25           |
| 试剂二                                                                                                                                | 50  | 50           |
| 充分混匀, 12000rpm, 25°C离心 10min, 弃上清, 留沉淀                                                                                             |     |              |
| 试剂三                                                                                                                                | 230 | 230          |
| 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。取 200 $\mu\text{L}$ 上清液转移至 96 孔板中, 于 415nm 处读取吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |              |