

过氧化氢含量 (H₂O₂) 试剂盒说明书

(货号:ADS-W-YH001-48 微板法 48 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

过氧化氢 (H₂O₂)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 H₂O₂ 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 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2mL 水, 涡旋振荡充分溶解, 若有沉淀, 可静置 10min (或更长时间) 或于 5000rpm 室温离心 5min, 取上清液用于检测; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂三	液体 12mL×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; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 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(10⁴):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：

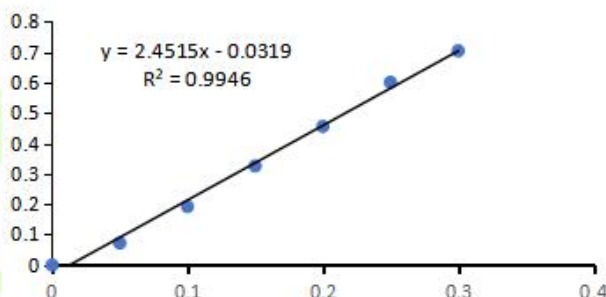
试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	250	
丙酮		250
试剂一	25	25
试剂二	50	50
充分混匀，12000rpm，25℃离心 10min，弃上清，留沉淀		
试剂三	230	230
加入试剂三溶解沉淀后混匀，若有沉淀产生，12000rpm 离心 2 分钟即可。 取 200μL 上清液转移至 96 孔板中， 于 415nm 处读取吸光值 A。ΔA = A 测定-A 空白。		

【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 μL 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 μL , 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 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 μL	0	50	100	150	200	250
丙酮 μL	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 (μL)	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 μL 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。		