

过氧化氢含量（H₂O₂）试剂盒说明书

（货号：BP10035F 分光法 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 瓶	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 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。 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 35mL×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）、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℃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。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤

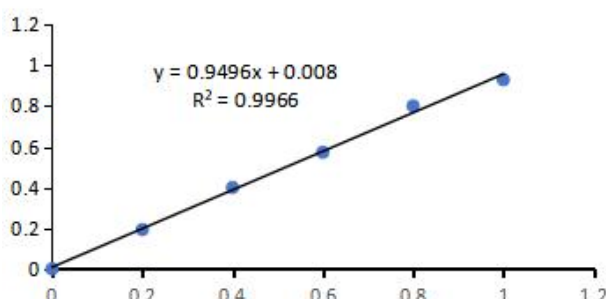
- ① 分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 415nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：
，调节波长至 415nm，蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入：

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℃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）。 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。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：

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

- 3、按照蛋白浓度计算：

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

- 4、按液体体积计算：

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

- 5、按细胞数量计算：

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

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.5mL；
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 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：0，0.4，0.8，1.2，1.6，2 $\mu\text{mol/mL}$ 。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 μL ，加入 900 μL 丙酮，混匀得到 2 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 μL	0	100	200	300	400	500
丙酮 μL	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 (μL)	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。 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。 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		