

过氧化氢含量（H₂O₂）试剂盒说明书

（货号：BP10036F 分光法 48 样 有效期：3 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。样本中过氧化氢与特异显色剂反应生成有色物质，该物质于 510nm 有特征吸收峰，进而通过计算得出样本中过氧化氢含量。

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
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃避光保存	
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、试验器材：

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、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 样本（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 预冷的提取液，进行冰浴匀浆，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):预冷提取液(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 预冷提取液，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）；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):预冷提取液(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 510nm，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	200	
提取液		200
试剂一	300	300

试剂二	200	200
充分混匀，室温静置（25℃）5min 后，于 510nm 读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

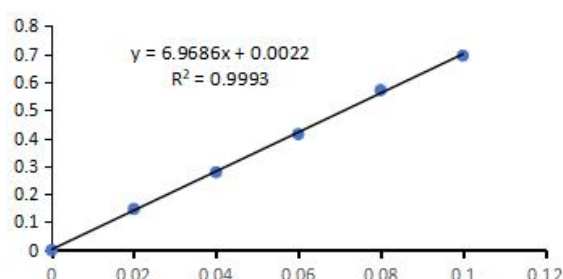
【注】：1.若 ΔA 超过 1.0 则可用蒸馏水稀释后再检测，计算公式乘以相应稀释倍数 D。

2.若 ΔA 值小于 0.01 可增加取样质量 W(如增加至 0.2g)或增加加样体积 V1（如由 200 μ L 增至 300 μ L，则试剂一相应减少），则改变后的 W 和 V1 代入公式重新计算。

3.若提取后的样本上清液有强背景色（如红色，粉红色，紫红色），可增设一个样本自身对照管：200 μ L 样本+300 μ L 试剂一+200 μ L 蒸馏水， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 6.9686x + 0.0022$ ：x 为标准品摩尔质量（ μ mol），y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0022) \div 6.9686] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.718 \times (\Delta A - 0.0022) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mg Prot}) &= [(\Delta A - 0.0022) \div 6.9686] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.718 \times (\Delta A - 0.0022) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A - 0.0022) \div 6.9686] \div V1 \times D = 0.718 \times (\Delta A - 0.0022) \times D$$

5、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0022) \div 6.9686] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D \\ &= 1.44 \times (\Delta A - 0.0022) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.2mL；

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（200 μ mol/mL）：临用前取出 10 μ L 标准品溶解在 0.499mL 蒸馏水中，充分混匀（现配现用）

- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。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 39.9ml 蒸馏水，混匀得到 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 μL	200	160	120	80	40	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	200	
蒸馏水		200
试剂一	300	300
试剂二	200	200
充分混匀，室温静置 (25 $^{\circ}\text{C}$) 5min 后，取全部液体于 1ml 比色皿中，于 510nm 读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		