

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

(货号:ADS-W-YH015-196 微板法 196 样)

### 一、产品简介:

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。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:

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求 | 备注              |
|------|--------------|------|-----------------|
| 提取液  | 液体 200mL×1 瓶 | 4℃保存 |                 |
| 试剂一  | 液体 24mL×1 瓶  | 4℃保存 |                 |
| 试剂二  | 液体 12mL×1 瓶  | 4℃保存 |                 |
| 标准品  | 液体 1 支       | 4℃保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

### 三、需自备的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵和冰。

### 四、过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备

##### 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 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(10<sup>4</sup>):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、上机检测

##### ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 510nm。

##### ② 在 96 孔板中依次加入:

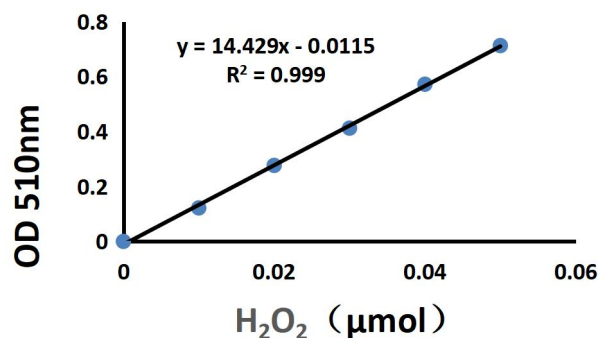
| 试剂名称 (μL)  | 测定管 | 空白管 (只做一次) |
|--|-----|------------|
| 样本   | 100 |            |
| 提取液  |     | 100        |
| 试剂一  | 100 | 100        |
| 试剂二  | 50  | 50         |
| 充分混匀, 室温静置 (25℃) 5min 后, 于 510nm 读取吸光值,<br>ΔA=A 测定-A 空白。 |     |            |

【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 $\Delta A$  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  $V_1$  (如由 100 $\mu$ L 增至 150 $\mu$ L, 则试剂一相应减少), 则改变后的  $W$  和  $V_1$  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: 100 $\mu$ L 样本+100 $\mu$ L 试剂一+50 $\mu$ 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:  $y=14.429x-0.0115$ :  $x$  为标准品摩尔质量 ( $\mu$ mol) ;  $y$  为  $\Delta A$ 。



- 2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0115) \div 14.429] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.69 \times (\Delta A + 0.0115) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0115) \div 14.429] \div (500 \times V_1 \div V) \times 10^3 \times D \\ &= 1.39 \times (\Delta A + 0.0115) \times D \end{aligned}$$

- 4、按液体体积计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 14.429] \div V_1 \times D = 0.69 \times (\Delta A + 0.0115) \times D$$

$V$ ---加入提取液体积, 1mL;

$V_1$ ---加入反应体系中样本体积, 0.1mL;

$W$ ---样本质量, g;

$D$ ---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (200 $\mu$ mol/mL): 临用前取出 10 $\mu$ L 标准品溶解在 0.499mL 水中, 充分混匀 (现配现用)。
- 2 把母液用水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。