

## 过氧化氢含量 ( $H_2O_2$ ) 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 ( $H_2O_2$ ) 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°C 保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1 支	4°C 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 ( $H_2O_2$ ) 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°C 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°C 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( $10^4$ ):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 ( $\mu L$ )	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

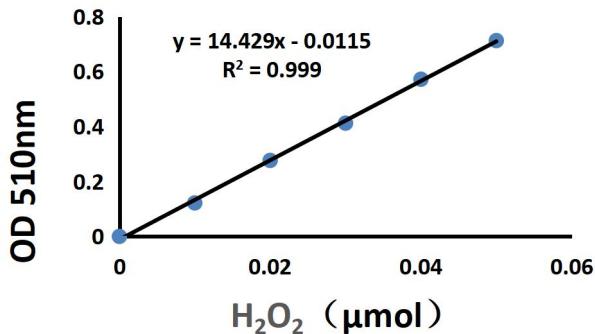
充分混匀，室温静置 (25°C) 5min 后，于 510nm 读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

【注】：1. 若  $\Delta A$  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 V1 (如由 100 $\mu\text{L}$  增至 150 $\mu\text{L}$ , 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: 100 $\mu\text{L}$  样本+100 $\mu\text{L}$  试剂一+50 $\mu\text{L}$  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 ( $\mu\text{mol}$ ) ; y 为  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0115) \div 14.429] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.69 \times (\Delta A + 0.0115) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量} (\text{nmoL}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0115) \div 14.429] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D \\ &= 1.39 \times (\Delta A + 0.0115) \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量} (\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 14.429] \div V1 \times D = 0.69 \times (\Delta A + 0.0115) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---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 $\mu\text{mol/mL}$ ): 临用前取出 10 $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{mol/mL}$ 。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。