

过氧化氢含量 (H₂O₂) 试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂×1 支	4℃保存	临用前加入 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。
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 40mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、丙酮、研钵和冰。

四、过氧化氢 (H₂O₂) 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 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、上机检测

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 415nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

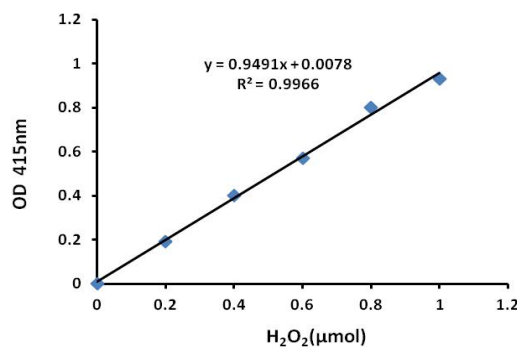
试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	500	
丙酮		500

试剂一	50	50
试剂二	100	100
充分混匀, 12000rpm, 25°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。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: $y = 0.9491x + 0.0078$: x 为标准品摩尔质量 (μmol), y 为 ΔA。



- 2、按照样本质量计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0078) \div 0.9491] \div (W \times V1 \div V) \times D = 2.1 \times (\Delta A - 0.0078) \div W \times D$$

- 3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0078) \div 0.9491] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D \\ &= 4.2 \times (\Delta A - 0.0078) \times D \end{aligned}$$

- 4、按液体体积计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0078) \div 0.9491] \div V1 \times D = 2.1 \times (\Delta A - 0.0078) \times D$$

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (20 μmol/mL): 标准品溶解在 4.99mL 丙酮中, 充分混匀。
- 2 把母液用丙酮稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μmol/mL。也可根据实际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。