过氧化氢含量（H_2O_2）试剂盒说明书

（分光法 48 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 H_2O_2 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	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体μL×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（H_2O_2）的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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(10^4):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℃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（光径 1cm）中，		

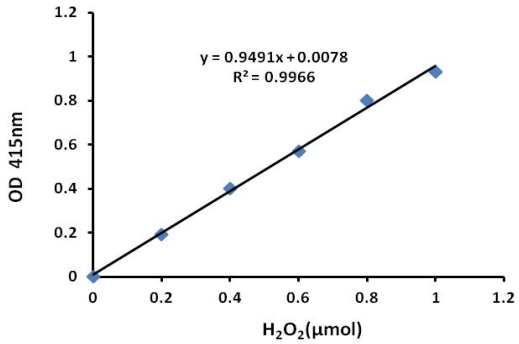
于 415nm 处读取吸光值 A。ΔA＝A 测定-A 空白。

【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：

H_2O_2 含量(μmol/g 鲜重)=[(ΔA-0.0078) ÷0.9491]÷(W×V1÷V)×D=2.1×(ΔA-0.0078)÷W×D

3、按细胞数量计算：

H_2O_2 含量(nmoL/10^4 cell)=[(ΔA-0.0078) ÷0.9491]÷(500×V1÷V)×10^3×D

=4.2×(△A+0.0329)×D

4、按液体体积计算：

H_2O_2 含量(μmol/mL)=[(ΔA-0.0078) ÷0.9491] ÷V1×D=2.1×(ΔA-0.0078)×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）：临用前取出 10μL 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。