

过氧化氢（H₂O₂）测试盒说明书

(货号:A064-2-1 微板法 96T)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理：

过氧化氢（H₂O₂）可以与钼酸作用生成一种络合物在 405nm 处有特征吸收，从而测定样本中 H₂O₂ 的量。

二、试剂组成与配制：(试剂盒有效期 6 个月)

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存（饱和溶液，如有结晶析出，可 60℃ 水浴加热溶解后使用）；

H₂O₂ 标准品：贮备液 0.5mL×1 瓶，4℃ 保存；临用前按

H₂O₂ 标准贮备液：蒸馏水=1：9 的比例混合，

充分混匀配成标准品应用液（163mmol/L），现用现配。

三、所需仪器及试剂：

酶标仪（405nm）及 96 孔板(附送一块)，蒸馏水。

四、操作方法：

1、样本前处理：

血清(浆)等液体样本：直接使用。

细胞培养液：吸取部分 8000 转/分，离心 5 分钟，取上清检测。

动物组织样本：准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,12000 转/分,离心 10 分钟,取上清液（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）待测。

植物组织样本：方法一是先将植物组织用 PBS 擦洗干净，再用吸水纸吸干，后剪碎放入研钵中，液氮研磨成粉，称取植物粉末，按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的 PBS,涡旋震荡（或研磨仪研磨）1 分钟，12000 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测；方法二是在洗净并擦干水分后，直接称重，按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的 PBS,冰水浴条件下机械匀浆,12000 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测。（注：一般水分含量较高的植物用方法二来处理，相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理）

细胞样本：收集细胞后，每份细胞（细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个，越多越好）加入 0.3mL 的生理盐水（或者 PBS），冰水浴下超声破碎（功率 200-300W，运行 5 秒，间隔 15 秒，反复 3-5 分钟），12000 转/分，离心 10 分钟，取上清液（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）待测。

2、操作表：

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水（μL）	10		
163mmol/L H ₂ O ₂ 标准品应用液（μL）		10	
样本（μL）			10
试剂一（μL）	100	100	100
轻轻振荡孔板，室温静置 3-5min，405nm 处酶标仪读取吸光值 A1			
试剂二（μL）	100	100	100
轻轻振荡孔板，室温静置 3-5min，405nm 处酶标仪读取吸光值 A2，计算ΔA=A2-A1。			

注：若测定孔ΔA>0.5，则需将样本作一定的稀释后再测；
若ΔA<0.01，则需将样本浓度加大或是样本量加大（如 20

或 30μL，最大不超过 50μL。样本量加大的同时，空白孔蒸馏水量及标准孔标准液量均需同时加大，且要提前将标准液浓度再进行相应倍数稀释，稀释倍数等同于加大的体积倍数）。

五、计算公式及举例：

1、液体样本计算公式：

$$\text{液体样本 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

2、组织（或细胞）样本按蛋白浓度计算公式：

$$\text{组织、细胞中 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (mmol/g 蛋白)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

3、组织样本按鲜重计算公式：

$$\text{组织中 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (μmol/g 鲜重)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

4、细胞样本按细胞数计算公式：

$$\text{细胞中 H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 (μmol/万个细胞)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

C_{标准}：标准液浓度 163mmol/L（μmol/mL）；

N：样本测试前稀释倍数；

C_{pr}：组织匀浆蛋白浓度，g/L；

W：组织样本重量，g；

V_{样总}：样本前处理（匀浆）时，加入的匀浆介质的体积，mL；

细胞总数：细胞在破碎前的细胞总数量，万个。

六、注意事项：

- 操作时孔板中不要引入气泡，以免影响读数；
- 空白孔读数时，ΔA 有可能会出现负值，是仪器与试剂共同作用的结果，属正常现象，计算时按实际值计算；
- 很多样本中 H₂O₂ 含量不高，即测定孔ΔA 值较小，可加大样本浓度或样本量再测。