

过氧化氢（H₂O₂）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC3595

规格：100T/96S、200T/192S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	100T 规格	200T 规格	保存条件
试剂一	自备试剂	自备试剂	-
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	液体 11 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

100T 溶液的配制：

- 1、试剂一：自备丙酮，大约需要 100mL，常温保存；盒内提供一 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。丙酮具有挥发性，使用时注意防护。
- 2、试剂二：临用前加入 3 mL 浓盐酸充分溶解（通风橱操作），用不完的试剂 2-8℃保存 4 周，用完及时封口。
- 3、标准品：1 mmol/mL H₂O₂ 标准品。

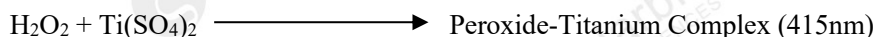
200T 溶液的配制：

1. 试剂一：自备丙酮，大约需要 200mL，常温保存；盒内提供一 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称口。
2. 试剂二：临用前加入 6 mL 浓盐酸充分溶解（通风橱操作），用不完的试剂 2-8℃保存 4 周，用完及时封口。
3. 标准品：1 mmol/mL H₂O₂ 标准品。

产品说明：

H₂O₂是生物体内最常见的活性氧分子，主要由SOD和XOD等催化产生，由CAT和POD等催化降解。H₂O₂不仅是重要的活性氧之一，也是活性氧相互转化的枢纽。一方面，H₂O₂可以直接或间接地氧化细胞内核酸，蛋白质等生物大分子，并使细胞膜遭受损害，从而加速细胞的衰老和解体；另一方面H₂O₂也是许多氧化应激反应中的关键调节因子。

H₂O₂与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物，在415nm有特征吸收。



技术指标：

最低检出限：0.0027 μmol/mL

线性范围：0.0195-3 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：





可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、丙酮(>98%, AR)、浓盐酸(37%, AR)、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理(可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 细菌或细胞样本的制备: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一, 超声波破碎细菌或细胞(功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织样本的制备: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆; 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清(浆)样本: 按照每 100μL 血清(浆)加入 0.9mL 试剂一的比例充分混匀; 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

注: 1. 由于试剂一(丙酮)易挥发, 试剂一必须先预冷再加, 研磨时必须在冰上研磨。

2. 若挥发较快, 可匀浆后用试剂一再次定容至 1mL。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至415nm, 分光光度计蒸馏水调零。
- 2、将试剂二、三和四37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴10min以上。
- 3、如果用96孔板将则用丙酮将 1mmol/mL 标准品稀释为 2μmol/mL 的标准品, 用微量玻璃比色皿则用丙酮将 1mmol/mL 标准品稀释为 1μmol/mL 的标准品。
- 4、在EP管中按顺序加入下列试剂

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	250		
标准品		250	
试剂一			250
试剂二	25	25	25
试剂三	50	50	50
4000g, 常温离心10min, 弃上清, 留沉淀(可先用丙酮清洗3-5次来洗去植物色素至沉淀呈白色至浅黄色)			
试剂四	250	250	250

加入试剂四, 充分震荡溶解沉淀后, 室温静置 5min, 取 200μL 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中测定 415nm 处吸光值。计算ΔA 测定=A 测定管-A 空白管, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。标准管和空白管仅需做 1-2 次。

三、H₂O₂含量计算

A、按96孔板计算

- 1、按照细菌、细胞数量计算:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (N \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \times F = 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

- 2、按组织质量计算:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标液}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \div V \text{ 提取} \times W) \times F \\ &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F \end{aligned}$$

- 3、按照蛋白浓度计算:



$$\text{H}_2\text{O}_2\text{含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标液}}) \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F \\ = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

4、按血清（浆）体积计算：

$$\text{H}_2\text{O}_2\text{含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标液}}) \times 10 \times F = 20 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

N：细胞或细菌总数，以万计；C标液：H₂O₂标准品浓度，2μmol/mL；V样本：加入的样本体积，0.25mL；

W：组织质量，g；V提取：提取过程中所用体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10：血清稀释倍数，[0.1mL血清（浆）+0.9mL试剂一]÷0.1mL血清（浆）=10；F：样本稀释倍数。

B、按微量玻璃比色皿计算

将公式中的C标液-2μmol/mL改为C标液-1μmol/mL进行计算即可。

注意事项：

- 1、本试剂盒中试剂的挥发性较高，请带一次性手套和口罩。
- 2、如果样本吸光值大于 1.1，建议将样本用试剂一稀释后进行测定。
- 3、试剂一会使蛋白变性，若按蛋白浓度计算需要另提组织重新测定蛋白浓度

实验实例：

1. 取 0.1g 心脏，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取全部上清液（注意吸取干净），置冰上，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.083-0.046=0.039，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.824-0.046=0.778，按样本质量计算含量得：

$$\text{H}_2\text{O}_2\text{含量}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$$

2. 取 0.1g 茶叶，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取全部上清液（注意吸取干净），置冰上，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.221-0.046=0.175，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.824-0.046=0.778，按样本质量计算含量得：

$$\text{H}_2\text{O}_2\text{含量}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 4.5 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$$

相关发表文献：

[1] Liu X, Matsumoto H, Lv T, Zhan C, Fang H, Pan Q, Xu H, Fan X, Chu T, Chen S, Qiao K, Ma Y, Sun L, Wang Q, Wang M. Phyllosphere microbiome induces host metabolic defence against rice false-smut disease. *Nat Microbiol.* 2023 Aug;8(8):1419-1433. doi: 10.1038/s41564-023-01379-x. Epub 2023 May 4. PMID: 37142774.

[2] Tian F, Wang S, Shi K, Zhong X, Gu Y, Fan Y, Zhang Y, Yang M. Dual-Depletion of Intratumoral Lactate and ATP with Radicals Generation for Cascade Metabolic-Chemodynamic Therapy. *Adv Sci (Weinh).* 2021 Dec;8(24):e2102595. doi: 10.1002/advs.202102595. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34716681; PMCID: PMC8693033.

[3] Wu H, Yang P, Li A, Jin X, Zhang Z, Lv H. Chlorella sp.-ameliorated undesirable microenvironment promotes diabetic wound healing. *Acta Pharm Sin B.* 2023 Jan;13(1):410-424. doi: 10.1016/j.apsb.2022.06.012. Epub 2022 Jun 23. PMID: 36815029; PMCID: PMC9939294.

[4] Xu N, Song Y, Zheng C, Li S, Yang Z, Jiang M. Indole-3-acetic acid and zinc synergistically mitigate positively charged nanoplastic-induced damage in rice. *J Hazard Mater.* 2023 Aug 5;455:131637. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131637. Epub 2023 May 13. PMID: 37210880.





[5] Yan Z, Liu C, Liu Y, Tan X, Li X, Shi Y, Ding C. The interaction of ZnO nanoparticles, Cr(VI), and microorganisms triggers a novel ROS scavenging strategy to inhibit microbial Cr(VI) reduction. J Hazard Mater. 2023 Feb 5;443(PtB):130375. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130375. Epub 2022 Nov 9. PMID: 36444067.

[6] Wang Y, Yue J, Yang N, Zheng C, Zheng Y, Wu X, Yang J, Zhang H, Liu L, Ning Y, Bhadauria V, Zhao W, Xie Q, Peng YL, Chen Q. An ERAD-related ubiquitin-conjugating enzyme boosts broad-spectrum disease resistance and yield in rice. Nat Food. 2023 Sep;4(9):774-787. doi: 10.1038/s43016-023-00820-y. Epub 2023 Aug 17. PMID: 37591962.

参考文献:

[1] Satterfield C N, Bonnell A H. Interferences in titanium sulfate method for hydrogen peroxide[J]. Analytical Chemistry, 1955, 27(7): 1174-1175.

[2] Amin V M, Olson N F. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in milk[J]. Journal of Dairy Science, 1967, 50(4): 461-464.

[3] Sima Y H, Yao J M, Hou Y S, et al. Variations of hydrogen peroxide and catalase expression in Bombyx eggs during diapause initiation and termination[J]. Archives of insect biochemistry and physiology, 2011, 77(2): 72-80.

相关系列产品:

BC0020/BC0025 丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒

BC1090/BC1095 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活性检测试剂盒

BC0690/BC0695 葡萄糖氧化酶 (GOD) 活性检测试剂盒

