过氧化氢含量（H_2O_2）试剂盒说明书

（ 微板法 96 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。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 瓶	4℃保存	临用前加入 4mL 水充分溶解备用
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 30mL×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：

酶标仪、96 孔板、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 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）：试剂一(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 液体样本：直接检测

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 415nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管（只做一次）
样本	250	
丙酮		250
试剂一	25	25
试剂二	50	50
充分混匀，12000rpm，25℃离心 10min，弃上清，留沉淀		
试剂三	230	230
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。取 200μL 上清液转移至 96 孔板中，于 415nm 处读取吸光值 A。ΔA＝A 测定-A 对照。		

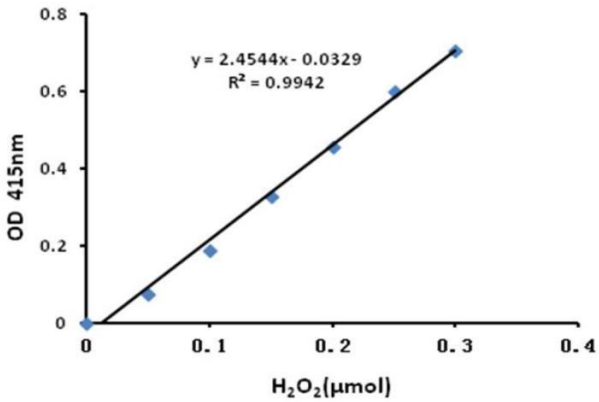
【注】：1. 吸光度ΔA 线性范围为 0.03-1.0，若ΔA 超过 1.0 则需要用丙酮稀释，计算公式乘以相应稀释倍数。

2. 对于色素含量高的样本可能在加入试剂三后出现悬浮黑色物质，可减少样本量（如减至 50μL，

则另加 200μL 丙酮，总共 250μL），或在加入试剂三前的沉淀中加入 250μL 丙酮混匀离心除去色素（重复 2 次）。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 2.2044x - 0.0268：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+0.0268) ÷2.2044]÷(W ×V1÷V)= 1.82×(ΔA+0.0268)÷W

3、按液体体积计算

H_2O_2含量（μmol/mL）＝[(ΔA+0.0268) ÷2.2044] ÷V1=1.82×(ΔA+0.0268)

V----加入提取液体积，1mL；　　V1----加入反应体系中样本体积，0.25mL；

W----样本质量，g

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 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1.0，1.2 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。