

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F001

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience®过氧化氢(H₂O₂)荧光法试剂盒

Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织，细胞中的过氧化氢含量。

检测原理

H_2O_2 在酶和荧光物质存在下反应，其在激发波长 535 nm 和发射波长 587 nm 处的荧光强度与过氧化氢浓度成正比。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法 (货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.06 mL×1 支	0.12 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	1 mol/L 过氧化氢标准品 (1 mol/L H_2O_2 Standard Solution)	0.1mL×1 支	0.1mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	碱试剂 (Alkali Reagent)	3 mL × 1 瓶	6 mL × 1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	广泛 pH 试纸	1 包		
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)、涡旋混匀仪、微量移液器(1000 μL ，200 μL ，100 μL ，10 μL)

耗材：枪头(1000 μL ，200 μL ，50 μL ，10 μL)

试剂：双蒸水

试剂准备

① 试剂三应用液的配制：

每支试剂三粉剂加入120 μL 试剂一溶解，混匀， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存1个月。

② 工作液的配制：

按试剂一：试剂二：试剂三应用液=48: 1: 1的比例配制，混匀，现用现配，按需配制。

③ 不同浓度标准品的稀释：

取10 μL 试剂四加入990 μL 试剂一，混匀，即为10 mM H_2O_2 ，取10 μL 10 mM H_2O_2 加入990 μL 试剂一，混匀，即为100 μM H_2O_2 ，按100 μM H_2O_2 ：试剂一 =1: 9的比例配制，混匀，即为10 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 。

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	0.5	1	2	4	6	8	10
10 $\mu\text{mol/L}$ 标准品 (μL)	0	10	20	40	80	120	160	200
试剂一(μL)	200	190	180	160	120	80	40	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：常规匀浆处理(匀浆介质为试剂一)。匀浆后，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 细胞加入 200 μ L 试剂一进行匀浆，12000 ×g 离心 10 min，取上清待用，保留部分上清用于蛋白测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.02-10 μ mol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	1-3 倍	HepG2 细胞上清	不稀释
小鼠血清	1-4 倍	10%小鼠肝匀浆	1-3 倍
小鼠血浆	1-2 倍	10%小鼠脑匀浆	1-3 倍
猪血清	1-3 倍	10%大鼠肺匀浆	1-3 倍
大鼠血清	1-4 倍	HepG2 细胞匀浆	1-2 倍

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 试剂二避免反复冻融，可分装-20℃后保存。
- ② 工作液配制完成后，必须避光。
- ③ 处理后的上清液 pH 必须在 6.5-8 之间。

操作步骤

样本前处理

按样本：试剂五=1:1 的比例，混匀，4℃，13000 ×g，离心 10 min，取 V₁ mL 上清，加 V₂ mL 试剂六调 pH 至 6.5-8 之间，即为待测样本。

注：初始可按 V₁=0.2 mL 的上清，加入 V₂=0.04 mL 的试剂六进行 pH 调节。

操作步骤

- ① 标准孔：取 50 μL 不同浓度的标准品加入到酶标板孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本加入到酶标板孔中。
- ② 向①步骤中标准孔、测定孔加入 50 μL 工作液。
- ③ 酶标仪振板 10 s，室温避光静置 10 min。
- ④ 荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
工作液(μL)	50	50
酶标仪振板 10 s，室温避光静置 10 min，荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，测定各孔荧光值		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)、尿液等液体样本中过氧化氢含量的计算:

$$\text{过氧化氢含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/L}) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \times 2 \times \left(\frac{V_1 + V_2}{V_1} \right) \times f$$

组织、细胞中过氧化氢含量的计算:

$$\text{过氧化氢含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/gprot}) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \times 2 \times \left(\frac{V_1 + V_2}{V_1} \right) \times f \div C_{pr}$$

注解:

ΔF : 测定孔荧光值-空白荧光值, 空白荧光值为标准品浓度为 0 时的荧光值

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

2: 样本前处理时, 样本: 试剂五=1: 1 混匀, 则样本中 H_2O_2 浓度稀释倍数为 2

V_1 : 样本前处理时, 上清液体积(mL)

V_2 : 样本前处理时, 试剂六的用量(mL)

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

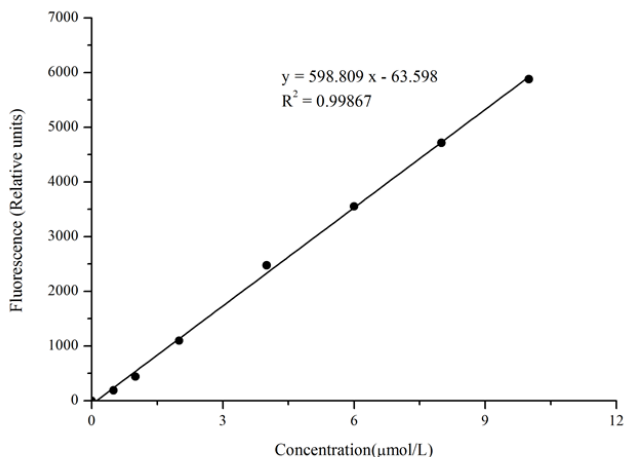
检测范围	0.02-10 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	3.6 %
灵敏度	0.02 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	1.1 %
平均回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量50 μL , 按照操作步骤进行实验, 荧光值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	0.5	1	2	4	6	8	10
荧光值	119	311	564	1226	2601	3691	4873	5998
	122	309	557	1210	2589	3658	4800	6002
平均荧光值	120	310	561	1218	2595	3674	4836	6000
绝对荧光值	0	190	441	1098	2475	3554	4716	5880

②绘制标曲(如下图):



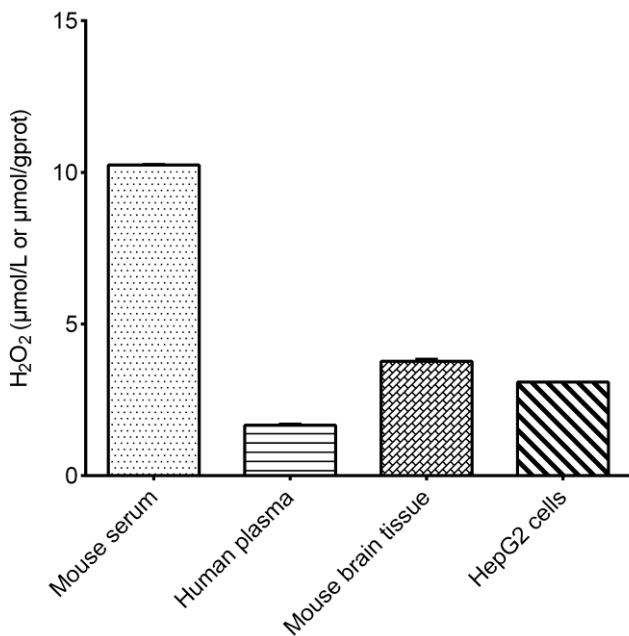
附录2 实例分析

例如检测小鼠脑组织(数据仅供参考):

将10%小鼠脑匀浆用试剂一稀释2倍,取0.2 mL稀释后的样本,加入0.2 mL试剂五,混匀,4℃,13000 × g,离心10 min,取0.2 mL上清,加0.04 mL试剂六调pH,即为待测样本,按操作表检测,结果如下:H₂O₂的标准曲线: $y = 556.7x + 11.559$,测定孔平均荧光值为2452,空白平均荧光值为80,同时测得蛋白浓度为5.40 gprot/L,计算结果为:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 浓度 } (\mu\text{mol/gprot}) = (2452 - 80 - 11.559) \div 556.7 \times 2 \times \left(\frac{0.2 + 0.04}{0.2} \right) \times 2 \div 5.4 = 3.77 \mu\text{mol/gprot}$$

按照说明书操作,测定小鼠血清(加样量50 μL)、人血浆(加样量50 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆,蛋白含量5.40 gprot/L,稀释2倍,加样量50 μL)、HepG2(蛋白含量6.44 gprot/L,加样量50 μL)中H₂O₂含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性	标准品浓度稀释错误	按照标准品稀释表重新稀释标准品
	计算错误	按照计算公式进行计算
	使用过期的试剂	选择在保质期内的试剂
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
	上清液的 pH 不在合适的范围	调上清液 pH 到 6.5-8 之间
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长
	试剂二未完全解冻	37℃使试剂二完全解冻

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose

- and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113
22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
 23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
 24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
 25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add - on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double - blind placebo - controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
 26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
 27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
 28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
 29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells - extracted microvesicles attenuate LPS - induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
 30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508