

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ007

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)荧光法测试盒

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

H₂O₂ 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：GBQ162)。

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 ₂ O 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		无要求
	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°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 μL 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 $\mu\text{mol/L}$ ，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：GBQ162)。

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：

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

组织、细胞中过氧化氢含量的计算：

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

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

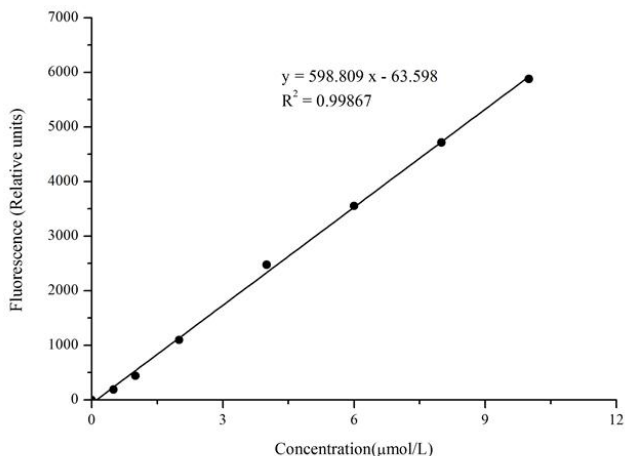
检测范围	0.02-10 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	3.6 %
灵敏度	0.02 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	1.1 %
平均回收率	100 %		

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):



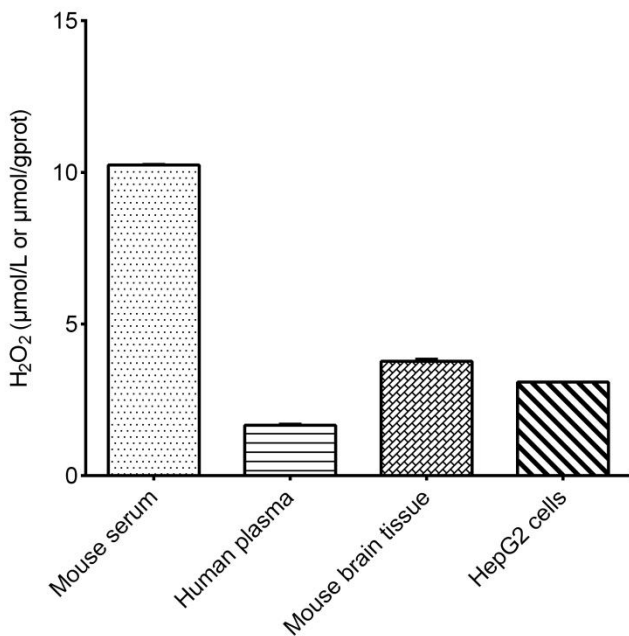
附录2 实例分析

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°C, 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 nanoplatfrom 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