

H₂S含量测定试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

H₂S是一种新型气态信号分子，存在于脑内的神经递质，生理浓度的H₂S对神经系统海马的长时程增强功能具有重要的调节作用，并对自发性高血压、出血性休克及肝硬化等疾病的过程发挥着重要的病理生理效应。

测定原理：

H₂S与醋酸锌、N, N-二甲基对苯二胺和硫酸铁铵等反应生成亚甲基蓝，亚甲基蓝在665nm处有最大吸收峰，通过测定其吸光值可计算H₂S含量。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、酶标仪、96孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体25mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体16mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体8mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂四：液体8mL×1瓶，4℃保存。

试剂五：液体1.5mL×1管，4℃避光保存。

样品处理：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，然后10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）：直接测定。

操作表：

1. 酶标仪预热30min，调节波长至665nm。
2. 操作表

	空白管	测定管
样品（ μ L）		150
H ₂ O（ μ L）	150	
试剂一（ μ L）	150	150

充分震荡混匀		
试剂二 (μL)	150	150
10000g, 4°C, 离心10min, 去上清, 留沉淀		
H2O (μL)	150	150
10000g, 4°C, 离心10min, 去上清, 留沉淀		
试剂一 (μL)	75	75
试剂三 (μL)	75	75
充分震荡混匀		
试剂四 (μL)	75	75
10000rpm, 4°C, 离心10min, 吸取200μL上清于96孔板中		
试剂五 (μL)	10	10
混匀, 25°C静置5min, 测定665nm吸光值, 记为A测定和A空白, ΔA=A测定-A空白。		

H2S含量计算公式:

用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为: $y = 0.0022x$, $R^2 = 0.9988$

(1) 组织样品

a.按照蛋白浓度计算

$$\text{H2S (nmol/mg prot)} = \frac{\square}{V_{\text{反总}}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 681.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

b.按照样本重量计算

$$\text{H2S (nmol/g 鲜重)} = \frac{\square}{V_{\text{反总}}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 681.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 细胞

$$\text{H2S (nmol/104 cell)} = \frac{\square}{V_{\text{反总}}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量(万个)}) = 681.8 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

$$(2) \text{液体样品H2S (nmol/mL)} = \frac{\square}{V_{\text{反总}}} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 681.8 \times \Delta A$$

V反总: 反应总体积, 0.225mL; V样: 反应中样品体积, 0.15mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL

注意事项

最低检出限为1nmol/mL。

www.affandi-e.com