

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（ μL ） | | 150 |
| H ₂ O（ μL ） | 150 | |

| | | |
|--|-----|-----|
| 试剂一 (μL) | 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 | | |
| H ₂ O (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

$$\text{H}_2\text{S (nmol/mg prot)} = \frac{\Delta A}{0.0022} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = 681.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

b. 按照样本重量计算

$$\text{H}_2\text{S (nmol/g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{0.0022} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 681.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 细胞

$$\text{H}_2\text{S (nmol/10}^4\text{ cell)} = \frac{\Delta A}{0.0022} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量(万个)}) = 681.8 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

$$(2) \text{液体样品 H}_2\text{S (nmol/mL)} = \frac{\Delta A}{0.0022} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 681.8 \times \Delta A$$

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。