

硫化氢 (H₂S) 含量荧光法检测试剂盒

产品货号: BA3475

产品规格: 50T/48S; 100T/96S

产品说明:

硫化氢(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 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,并在自发性高血压、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。

H₂S 特异性还原荧光探针 7-叠氮基 4-甲基香豆素(AzMC)的芳香叠氮基团,生成荧光物质 7-氨基-4-甲基香豆素(AMC),其在激发波长 355nm、发射波长 445nm 的荧光强度与 H₂S 含量成正比。

注意:实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	50T/48S	100T/96S	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃
试剂一	液体 7mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	液体 0.35mL×1 支	液体 0.6mL×1 支	-20℃, 避光
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二:融化后使用掌上离心机离心至管底,根据样本量分装,当天使用的常温避光保存,其余的-20℃避光保存,避免反复冻融。
2. 工作液:临用前根据样本量按照试剂一:试剂二=0.95mL:0.05mL(1mL, 10T)的比例配制工作液,现用现配,避光保存。
3. 标准品:临用前加入 1mL 提取液,充分溶解,配制成 100mmol/L 标准品, -20℃分装保存 1 周。

需自备的仪器和用品:

荧光酶标仪、天平、低温台式离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、封板膜、96 孔全黑酶标板、EP 管、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理(可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

1. 组织样本: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。10000g, 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。
2. 细菌/细胞样本:按照细胞数量(10⁷个):提取液体积(mL)为 1-2:1 的比例(建议 1×10⁷ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液),冰浴超声波破碎细菌/细胞(功率 200W,超声 3 秒,间隔 7 秒,总时间 3min);然后 10000g, 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。
3. 血清(浆)等液体样本:按照液体体积(mL):提取液体积(mL)为 1:1 的比例(建议量取 0.5mL 液体样本,加入 0.5mL 提取液)进行混合。10000g, 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

二、测定步骤



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1. 荧光酶标仪预热 30min 以上，调节至激发波长 355nm，发射波长 445nm。
2. 临用前工作液平衡至常温。
3. 标准品的稀释：将 100mmol/L(100000μmol/L)标准品用提取液稀释至 2000μmol/L，再用提取液稀释至 50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125μmol/L 的标准品备用。
4. 标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μmol/L)	标准品体积 (μL)	提取液体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/L)
1	100000	20	980	2000
2	2000	25	975	50
3	50	500	500	25
4	25	500	500	12.5
5	12.5	500	500	6.25
6	6.25	500	500	3.125
7	3.125	500	500	1.5625
8	1.5625	500	500	0.78125

备注：下述实验中每个标准管需 100μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测荧光值）。

5. 在 96 孔黑色酶标板按下表步骤加样：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
工作液	100	100	100
样本	100	-	-
标准品	-	100	-
提取液	-	-	100

混匀，常温避光反应 40min，反应完成后于 Ex/Em=355nm/445nm 处测定荧光值 RFU，分别记为 RFU_{测定}、RFU_{标准}和 RFU_{空白}， $\Delta RFU_{测定} = RFU_{测定} - RFU_{空白}$ ， $\Delta RFU_{标准} = RFU_{标准} - RFU_{空白}$ 。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。

注 1：建议在 96 孔黑色酶标板中加入样本/标准品/提取液时，将吸头伸入工作液液面以下加样，同时避免剧烈混匀以免产生大量气泡，气泡会影响荧光酶标仪顶读模式的检测。

注 2：在做标曲或者 H₂S 含量较高的样本时，建议使用封板膜密封 96 孔黑色酶标板，防止 H₂S 逸散到相邻孔的反应液中影响结果。

三、H₂S 含量计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度(x, μmol/L)和荧光值 $\Delta RFU_{标准}$ (y, $\Delta RFU_{标准}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta RFU_{测定}$ (y, $\Delta RFU_{测定}$)带入公式计算得到样本浓度(x, μmol/L)。

2. H₂S 含量的计算：

- (1) 按样本质量计算：H₂S 含量(μmol/g 质量)= $x \times V_{提取} \div W \times F = 0.001 \times x \div W \times F$
- (2) 按细胞/细菌数量计算：H₂S 含量(μmol/10⁷cell)= $x \times V_{提取} \div N \times F = 0.001 \times x \div N \times F$
- (3) 按样本蛋白浓度计算：H₂S 含量(μmol/g prot)= $x \times V_{样本} \div (V_{样本} \times C_{pr}) \times F = x \div C_{pr} \times F$
- (4) 按血清(浆)等液体体积计算：H₂S 含量(μmol/L)= $x \times 2 \times F = 2x \times F$

V_{提取}：样本处理时加入提取液体积，0.001L；V_{样本}：反应时加入的样本体积，0.0001L；W：样本质量，g；N：细胞/细菌总数，以 10⁷ 计；C_{pr}：样本蛋白浓度，g/L，蛋白浓度需自行测定；2：液体样本处理过程中的稀释倍数；F：样本稀释倍数。

注意事项：

1. 硫化氢有刺激性气味，易挥发，建议在通风橱进行实验操作，做好防护。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 如果测定值超过标准曲线最大值，可以用提取液稀释样本后再进行测定；如果测定值低于标准曲线最小值，可以增大样本处理时的样本加入比例；注意同步修改计算公式。
- 不同荧光酶标仪灵敏度不同，检测得到的荧光值 RFU 可能存在差异，属于正常现象。确定试剂配制和实验操作无误，标准曲线线性良好，检测结果就是准确有效的。

实验实例：

- 取 100mmol/L 标准品，稀释至 50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125 μ mol/L，检测各标准管荧光值，建立得到标准曲线 $y=119.04x-89.758$ ， $R^2=0.9992$ 。
- 不同类型样本检测结果如下：

样本	质量/g	RFU _{测定}	RFU _{空白}	X (μ mol/L)	H ₂ S 含量	单位
大鼠脑	0.1005	396.797	316.612	1.428	0.014	μ mol/g 质量
鸢尾根	0.1002	364.275	316.612	1.154	0.012	μ mol/g 质量
大鼠血浆	-	574.678	316.612	2.922	5.844	μ mol/L
酒发酵液	-	2589.422	316.612	19.847	39.694	μ mol/L

注：样本处理过程中，大鼠脑和鸢尾根称取约 0.1g 加入 1mL 提取液进行匀浆处理，大鼠血浆与提取液按照 1:1 比例混合进行后续处理。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>