

H₂S 含量检测试剂盒（微量法）

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。

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。

样本处理：

- 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。
- 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。
- 血清（浆）：**直接测定。

测定步骤：

- 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℃, 离心 10min, 去上清, 留沉淀		
H ₂ O (μL)	150	150
10000g, 4℃, 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℃, 离心 10min, 吸取 200μL 上清于 96 孔板中		
试剂五 (μL)	10	10
混匀, 25℃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

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

b.按照样本重量计算

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

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

(3) 细胞

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

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。