

硫化氢含量

规格：分光光度法 48 样

编号：H2S-F48-N(1720)

检测原理：亚甲基蓝法

检测波长：665nm

注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

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：

硫化物(H₂S、HS⁻、S²⁻)与 N,N-二甲基对苯二胺和硫酸铁铵在酸性条件下反应生成亚甲基蓝，亚甲基蓝在 665nm 处有最大吸收峰，通过测定其吸光值可计算含量。

自备仪器和用品：

分光光度计、1mL 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、烘箱、震荡仪、冰、蒸馏水

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
碱性保护剂	液体 120mL	x1	4°C	
试剂一	液体 16mL	x1	4°C,避光	
试剂二	液体 8mL	x1	4°C,避光	
蛋白沉淀剂	液体 20mL	x1	4°C	
标准品	粉剂	x1	4°C	3.9mg 硫化钠 标准粉剂

样本处理（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

- 1、按照质量(g)：碱性保护剂体积(mL)为 1：5~10 的比例加入碱性保护剂，冰浴匀浆；
(样本取样量记为 W，碱性保护剂用量记为 V_提)
(建议先尝试 0.1g：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少操作用量)
- 1、然后 10,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测（记为样本待测液）。

二、细菌/细胞样本

- 1、按照细胞数量 (10^4 个)：碱性保护剂体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例加入碱性保护剂，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；
(样本取样量记为 N (万个)，碱性保护剂用量记为 V_提)
(建议先尝试 500 万：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少操作用量)
- 2、然后 10,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测（记为样本待测液）。

三、液体样本

- 1、取 300μL 样本，加入 300μL 碱性保护剂，混匀；
(样本取样量记为 V，碱性保护剂用量记为 V_提)
(样本量较少时可等比例减少操作用量)
- 2、然后 10,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测（记为样本待测液）。

注意：

样本提取后，应注意及时密封，并建议尽快完成检测；

实验准备:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 665nm;

测定操作:

- 1、在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (*只做一管)
碱性保护剂	400	800
样本待测液	400	-
试剂一	250	250
试剂二	100	100
混匀, 室温(25°C)静置 10min 取 1mL 至 1mL 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)中 于 665nm 测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意:

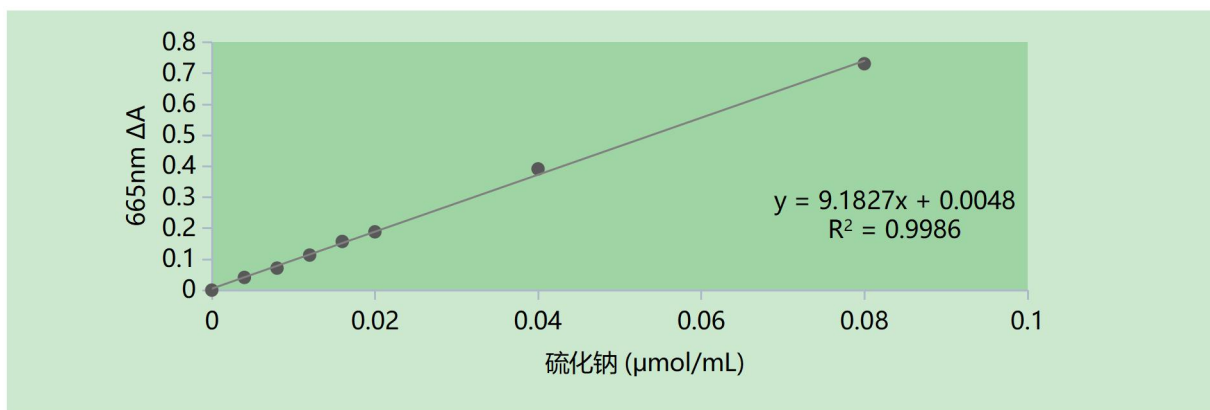
- 1、高蛋白样本建议采用【附 2: 对于高蛋白样本的检测方案 (参考)】检测方案, 以去除蛋白在酸性条件下浑浊的检测影响;
- 2、若 $\Delta A > 0.8$ 则超出试剂盒线性范围, 建议将样本待测液用碱性保护剂稀释后测定, 稀释倍数(D)代入公式计算;
- 3、若 $\Delta A < 0.02$, 建议尝试增加样本量(W 或 N)测定; 或适当增加样本加样量($V_{\text{样}}$), 并相应减少碱性保护剂 (如由 400μL 增加为 800μL 样本+0μL 碱性保护剂, 其他试剂不变);

参考下表:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
碱性保护剂	-	800
样本待测液	800	-
试剂一	250	250
试剂二	100	100

(改变的数据代入公式重新计算: $V_{\text{样}} = 0.8\text{mL}$)

结果计算:



(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A - 0.0048) \div 9.1827] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (W \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.1089 \times (\Delta A - 0.0048) \div W \times D\end{aligned}$$

W: 样本质量, g;

V_提: 样本处理时碱性保护剂用量, 1mL

(2) 按照细胞/细菌数量计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0048) \div 9.1827] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (N \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.1089 \times (\Delta A - 0.0048) \div N \times D\end{aligned}$$

N: 细菌/细胞数量, 万个;

V_提: 样本处理时碱性保护剂用量, 1mL

(3) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - 0.0048) \div 9.1827] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (V \div (V + V_{\text{提}})) \times D \\ &= 0.2178 \times (\Delta A - 0.0048) \times D\end{aligned}$$

V: 样本处理时的样本取样量, 0.3mL;

V_提: 样本处理时碱性保护剂用量, 0.3mL;

V_样: 测定操作中样本待测液加样量, 0.4mL;

V_标: 标准曲线中标准品加样量, 0.4mL;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

附 1：标准曲线的绘制（选做）

- 1、标准品^① 管中加入 0.5mL 碱性保护剂充分溶解即为 100 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液；
- 2、将标准品(100 $\mu\text{mol/mL}$) 使用碱性保护剂稀释为 0.08、0.06、0.04、0.02、0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 待测；
(也可根据自身实验需求调整标准品浓度；标准品溶解后较不稳定，不建议长期保存)
- 3、依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线

1) 在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	标准管	空白管 (*只做一管)
碱性保护剂	400	800
标准品	400	-
试剂一	250	250
试剂二	100	100
混匀，室温(25°C)静置 10min 取 1mL 至 1mL 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)中 于 665nm 测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

- 4、以标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$) 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，即可得到线性方程 $y=kx+b$ ，替代结果计算中的标准曲线方程；

^① 标准粉剂 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖

附 2：对于高蛋白样本的检测方案（参考）

1、因显色步骤需要在酸性环境下进行，对于高蛋白样本使用常规检测方案会浑浊，此类样本建议尝试使用此方案；

2、样本处理：

1) 样本使用原方案处理后，得样本待测液；

3、测定操作

1) 在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (*只做一管)
碱性保护剂	560	840
样本待测液	280	-
试剂一	200	200
试剂二	80	80
混匀，室温(25℃)静置 10min		
蛋白沉淀剂	280	280
混匀，10,000g 离心力 4℃ 离心 5min 取 1mL 上清液 至 1cm 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)中 于 665nm 测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意:

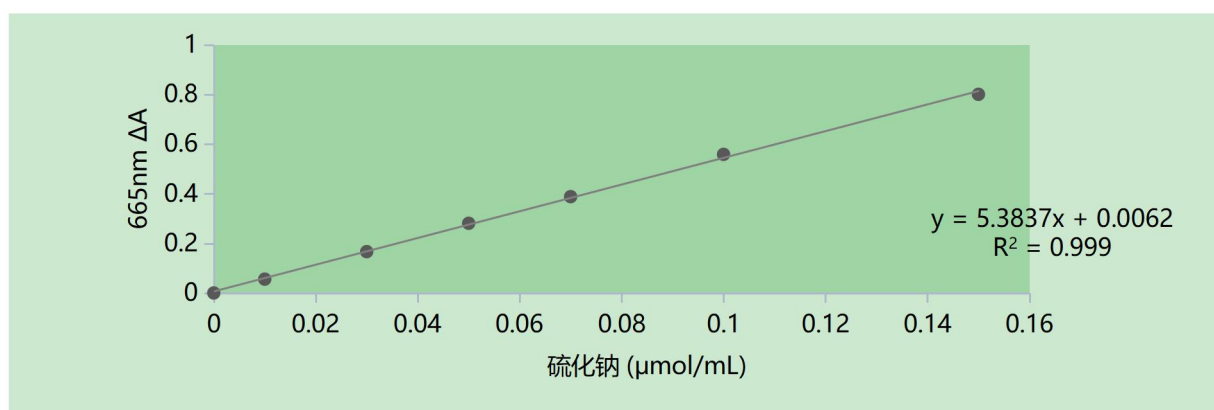
- 1) 若离心后蛋白无法完全沉淀(蛋白含量较高) 或 $\Delta A > 0.75$ (超出试剂盒线性范围), 建议将样本待测液用碱性保护剂稀释后测定, 稀释倍数(D)代入公式计算;
- 2) 若 $\Delta A < 0.02$, 建议尝试增加样本量(W 或 N)测定; 或适当增加样本加样量($V_{\text{样}}$), 并相应减少碱性保护剂 (如由 280 μL 增加为 560 μL 样本+280 μL 碱性保护剂, 其他试剂不变);

参考下表:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
碱性保护剂	280	840
样本待测液	560	-
试剂一	200	200
试剂二	80	80

(改变的数据代入公式重新计算: $V_{\text{样}}=0.56\text{mL}$)

4、高蛋白样本检测方案的结果计算



(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{硫化氢含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 5.3837] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (W \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.1857 \times (\Delta A - 0.0062) \div W \times D \end{aligned}$$

W: 样本质量, g;

$V_{\text{提}}$: 样本处理时碱性保护剂用量, 1mL

(2) 按照细胞/细菌数量计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 5.3837] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (N \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.1857 \times (\Delta A - 0.0062) \div N \times D\end{aligned}$$

N: 细菌/细胞数量, 万个;

$V_{\text{提}}$: 样本处理时碱性保护剂用量, 1mL

(3) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 5.3837] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (V \div (V + V_{\text{提}})) \times D \\ &= 0.3715 \times (\Delta A - 0.0062) \times D\end{aligned}$$

V: 样本处理时的样本取样量, 0.3mL;

$V_{\text{提}}$: 样本处理时碱性保护剂用量, 0.3mL;

$V_{\text{样}}$: 测定操作中样本待测液加样量, 0.28mL;

$V_{\text{标}}$: 标准曲线中标准品加样量, 0.28mL;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

5、高蛋白样本检测方案的标准曲线绘制（选做）

- 1) 标准品^① 管中加入 0.5mL 碱性保护剂充分溶解即为 100 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液；
- 2) 将标准品(100 $\mu\text{mol/mL}$) 使用碱性保护剂稀释为 0.15、0.1、0.07、0.05、0.03 $\mu\text{mol/mL}$ 待测；
(也可根据自身实验需求调整标准品浓度；标准品溶解后较不稳定，不建议长期保存)
- 3) 依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线

在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	标准管	空白管 (*只做一管)
碱性保护剂	560	840
标准品	280	-
试剂一	200	200
试剂二	80	80
混匀，室温(25°C)静置 10min		
蛋白沉淀剂	280	280
混匀，室温(25°C)静置 5min 取 1mL 至 1cm 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)中 于 665nm 测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

- 4) 以标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$) 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，即可得到线性方程 $y=kx+b$ ，替代结果计算中的标准曲线方程

^① 标准粉剂 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖