

## 硫化氢含量

规格：微量法 96 样

编号：H2S-W96-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：

H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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(H<sub>2</sub>S、HS<sup>-</sup>、S<sup>2-</sup>)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：

酶标仪、96 孔板、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 100mL | x2 | 4°C    |                   |
| 试剂一   | 液体 8mL   | x1 | 4°C,避光 |                   |
| 试剂二   | 液体 4mL   | x1 | 4°C,避光 |                   |
| 蛋白沉淀剂 | 液体 10mL  | x1 | 4°C    |                   |
| 标准品   | 粉剂       | x1 | 4°C    | 3.9mg 硫化钠<br>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<sub>提</sub>)**  
(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<sub>提</sub>)**  
(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 100μL 样本，加入 100μL 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<sub>提</sub>)**  
(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、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 665nm;

## 测定操作:

- 1、在 96 孔板中依次操作

| 试剂名称 (μL)                                                                           | 测定管 | 空白管<br>(*只做一管) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| 碱性保护剂                                                                               | 80  | 160            |
| 样本待测液                                                                               | 80  | -              |
| 试剂一                                                                                 | 50  | 50             |
| 试剂二                                                                                 | 20  | 20             |
| 混匀, 室温(25°C)静置 10min, 于 665nm 测定吸光值 A<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ |     |                |

## 注意:

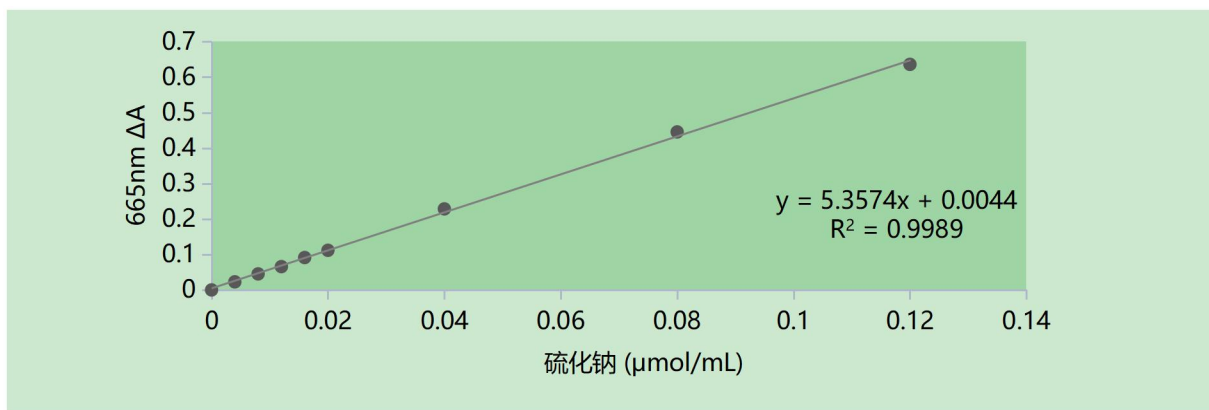
- 1、高蛋白样本建议采用【附 2: 对于高蛋白样本的检测方案 (参考)】检测方案, 以去除蛋白在酸性条件下浑浊的检测影响;
- 2、若  $\Delta A > 0.7$  则超出试剂盒线性范围, 建议将样本待测液用碱性保护剂稀释后测定, 稀释倍数(D)代入公式计算;
- 3、若  $\Delta A < 0.02$ , 建议尝试增加样本量(W 或 N)测定; 或适当增加样本加样量( $V_{\text{样}}$ ), 并相应减少碱性保护剂 (如由 80μL 增加为 160μL 样本+0μL 碱性保护剂, 其他试剂不变);

参考下表:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 空白管 |
|-----------|-----|-----|
| 碱性保护剂     | -   | 160 |
| 样本待测液     | 160 | -   |
| 试剂一       | 50  | 50  |
| 试剂二       | 20  | 20  |

(改变的数据代入公式重新计算:  $V_{\text{样}} = 0.16\text{mL}$ )

## 结果计算:



### (1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A - 0.0044) \div 5.3574] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (W \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.1867 \times (\Delta A - 0.0044) \div W \times D\end{aligned}$$

W: 样本质量, g;

V<sub>提</sub>: 样本处理时碱性保护剂用量, 1mL

### (2) 按照细胞/细菌数量计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0044) \div 5.3574] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (N \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.1867 \times (\Delta A - 0.0044) \div N \times D\end{aligned}$$

N: 细菌/细胞数量, 万个;

V<sub>提</sub>: 样本处理时碱性保护剂用量, 1mL

### (3) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - 0.0044) \div 5.3574] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (V \div (V + V_{\text{提}})) \times D \\ &= 0.3733 \times (\Delta A - 0.0044) \times D\end{aligned}$$

V: 样本处理时的样本取样量, 0.1mL;

V<sub>提</sub>: 样本处理时碱性保护剂用量, 0.1mL;

V<sub>样</sub>: 测定操作中样本待测液加样量, 0.08mL;

V<sub>标</sub>: 标准曲线中标准品加样量, 0.08mL;

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<sup>①</sup> 管中加入 0.5mL 碱性保护剂充分溶解即为 100 μmol/mL 标准溶液；
- 2、将标准品(100μmol/mL) 使用碱性保护剂稀释为 0.1、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01 μmol/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 96 孔板中依次操作

| 试剂名称 (μL)                                                                        | 标准管 | 空白管<br>(*只做一管) |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| 碱性保护剂                                                                            | 80  | 160            |
| 标准品                                                                              | 80  | -              |
| 试剂一                                                                              | 50  | 50             |
| 试剂二                                                                              | 20  | 20             |
| 混匀，室温(25℃)静置 10min，于 665nm 测定吸光值 A<br>$\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ |     |                |

- 4、以标准品浓度 (μmol/mL) 为横坐标 (x)，以其对应的 $\Delta A$  ( $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ) 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；

<sup>①</sup> 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<br>(*只做一管) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| 碱性保护剂                                                                                                  | 140 | 210            |
| 样本待测液                                                                                                  | 70  | -              |
| 试剂一                                                                                                    | 50  | 50             |
| 试剂二                                                                                                    | 20  | 20             |
| 混匀，室温(25℃)静置 10min                                                                                     |     |                |
| 蛋白沉淀剂                                                                                                  | 70  | 70             |
| 混匀，10,000g 离心力 4℃ 离心 5min<br>取 200μL 上清液 于 665nm 测定吸光值 A<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ |     |                |

**注意:**

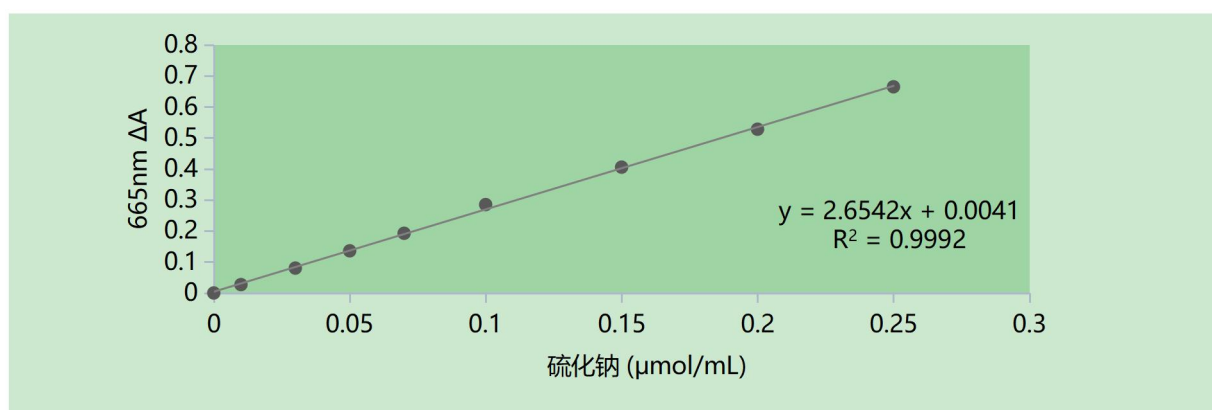
- 1) 若离心后蛋白无法完全沉淀(蛋白含量较高) 或  $\Delta A > 0.65$  (超出试剂盒线性范围), 建议将样本待测液用碱性保护剂稀释后测定, 稀释倍数(D)代入公式计算;
- 2) 若  $\Delta A < 0.02$ , 建议尝试增加样本量(W 或 N)测定; 或适当增加样本加样量( $V_{\text{样}}$ ), 并相应减少碱性保护剂 (如由 70 $\mu\text{L}$  增加为 140 $\mu\text{L}$  样本+70 $\mu\text{L}$  碱性保护剂, 其他试剂不变);

参考下表:

| 试剂名称 ( $\mu\text{L}$ ) | 测定管 | 空白管 |
|------------------------|-----|-----|
| 碱性保护剂                  | 70  | 210 |
| 样本待测液                  | 140 | -   |
| 试剂一                    | 50  | 50  |
| 试剂二                    | 20  | 20  |

(改变的数据代入公式重新计算:  $V_{\text{样}}=0.14\text{mL}$ )

#### 4、高蛋白样本检测方案的结果计算



(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{硫化氢含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 2.6542] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (W \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.3768 \times (\Delta A - 0.0041) \div W \times D \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 2.6542] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (N \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.3768 \times (\Delta A - 0.0041) \div N \times D\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}\text{硫化氢含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 2.6542] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \div (V \div (V + V_{\text{提}})) \times D \\ &= 0.7535 \times (\Delta A - 0.0041) \times D\end{aligned}$$

V: 样本处理时的样本取样量, 0.1mL;

$V_{\text{提}}$ : 样本处理时碱性保护剂用量, 0.1mL;

$V_{\text{样}}$ : 测定操作中样本待测液加样量, 0.07mL;

$V_{\text{标}}$ : 标准曲线中标准品加样量, 0.07mL;

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<sup>①</sup> 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 0.25、0.2、0.15、0.1、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 ( $\mu\text{L}$ )                                                                                  | 标准管 | 空白管<br>(*只做一管) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| 碱性保护剂                                                                                                   | 140 | 210            |
| 标准品                                                                                                     | 70  | -              |
| 试剂一                                                                                                     | 50  | 50             |
| 试剂二                                                                                                     | 20  | 20             |
| 混匀，室温(25°C)静置 10min                                                                                     |     |                |
| 蛋白沉淀剂                                                                                                   | 70  | 70             |
| 混匀，室温(25°C)静置 5min<br>取 200 $\mu\text{L}$ 于 665nm 测定吸光值 A<br>$\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ |     |                |

- 4) 以标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) 为横坐标 (x)，以其对应的 $\Delta A$  ( $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ) 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

<sup>①</sup> 标准粉剂 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖