



内源性一氧化碳（CO）测试盒说明书(精简版)

(货号：A101-3-1 测血清、血浆 100T/50 样)

一、检测意义：

一氧化碳（carbon monoxide, CO）是与一氧化氮（NO）极相似的小分子气态物质。90 年代以来的大量研究揭示，生物体内源性 CO 不仅作为一种新型的神经递质参与中枢神经系统的信息传递，还具有舒张血管、抑制血管平滑肌和血管内膜增殖、抑制血小板聚集、调节体内激素分泌、抑制细胞凋亡等多种生物学功能，在机体多种生理及病理状态中发挥重要的作用。

二、测定原理：

根据碳氧血红蛋白（HbCO）和还原血红蛋白（Hb）吸收光谱的差异，选择 HbCO 吸光度之差最大而 Hb 吸光度之差为零的两个波长，应用双波长分光光度法测定样本在这两个波长下的吸光度差值（ ΔOD ），再通过标准曲线求出 HbCO 百分浓度，代入公式计算出内源性一氧化碳（CO）含量。

三、试剂组成及配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：溶血剂，100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：缓冲液，100mL×3 瓶，4℃保存。

试剂三：碳氧血红蛋白测定粉剂×10 瓶，4℃避光密封保存。临用前，往每瓶测定粉剂中加入 23mL 试剂二缓冲液，加盖颠倒混合，使完全溶解配成**碳氧血红蛋白测定工作液**，现用现配，用多少配多少，2 小时内用完，用黑袋注意避光。

试剂四：制作 HbCO 百分曲线用的还原粉剂×6 支，4℃避光密封保存。

试剂五：血红蛋白 Hb 测定浓缩液，2mL×1 支，4℃避光密封保存。临用前将浓缩液用蒸馏水 1：99 稀释，即 100 倍稀释配成**血红蛋白 Hb 测定应用液**，现用现配。配好的试剂 2~8℃避光保存，可存放 1 个月以上。

四、所需仪器耗材及试剂：

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿，台式低速离心机，各种规格移液器，蒸馏水，涡旋混匀器，试管或离心管。

五、操作步骤：

1、血清（浆）中血红蛋白 Hb 测定及计算：

取 0.05mL 样本（血清、血浆）与 2.5mL 的血红蛋白测定应用液（即将试剂五的浓缩液进行 100 倍稀释），混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径蒸馏水调零，540nm 测定各管吸光度值。

血红蛋白含量的计算：

血红蛋白克数/升 = 540nm 处吸光度值 × 73.54

2、样本前处理：

- ①、制备**溶血液**：取抗凝全血 0.01mL，加入试剂一溶血剂 1.2mL 混匀，静置 5 分钟，使溶血完全。
- ②、制备**测定样本**：取制备好的溶血液 0.1mL，加待测血浆 0.1mL，混合后制备成**测定样本**。
- ③、制备**对照样本**：取制备好的溶血液 0.1mL，加待测双蒸水 0.1mL，混合后制备成**对照样本**。

3、血清（浆）中碳氧血红蛋白测定

加入物	测定管	对照管
经过前处理的血浆 测定样本 （mL）	0.2mL	
经过前处理的血浆 对照样本 （mL）		0.2mL
试剂三 碳氧血红蛋白测定工作液（mL）	2.3mL	2.3mL

混匀，静置 10 分钟后，试剂二缓冲液调零，1cm 光径，分别测各管 568nm 与 581nm 的吸光度，计算每只样本的绝对吸光度值。

4、计算公式：

绝对吸光度 ΔOD 值 = 测定管 ΔOD （ $A_{568}-A_{581}$ ）—对照管 ΔOD （ $A_{568}-A_{581}$ ），通过回归方程计算 $HbCO\% = [0.822 \times \text{绝对吸光度 } \Delta OD \text{ 值} + 0.001] \times 100\%$ 。

血清（浆）中一氧化碳 $\text{HbCO} \times \text{Hb} \text{ (g/L)} \times 10^6 \times 4$
(CO) 含量 ($\mu\text{mol/L}$) = $\frac{64456}{64456}$

【注 1】回归方程的相关数据见**碳氧血红蛋白（HbCO）百分浓度曲线**的拟合计算。

【注 2】64546 为 Hb 分子量

【注 3】4 表示一个 Hb 结合四个 CO

六、碳氧血红蛋白（HbCO）百分浓度曲线：

【可自行制作 HbCO 百分浓度曲线，也可参照本所提供的 HbCO 百分浓度曲线】

○ 饱和碳氧血红蛋白与饱和还原血红蛋白的制备

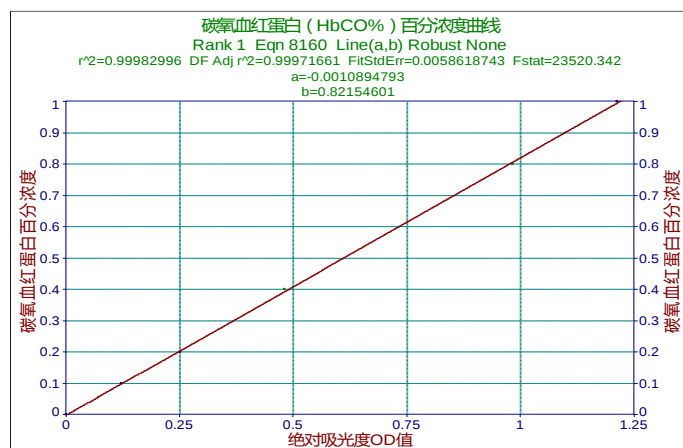
- 1、取不吸烟健康人肝素抗凝全血 0.01mL，加入试剂一溶血液 1.2mL 混匀，静置 5 分钟使溶血完全。
- 2、从中取 2 份，每份 0.2mL，加入到两支具塞试管中，再分别加入 2.3mL 试剂二缓冲液，混匀。
- 3、在通风橱内，向其中一支试管中通纯一氧化碳（CO），连续通 15 分钟，再通入氮气 20 分钟，得到饱和 HbCO 溶液。
- 4、再向另一支试管通氧气（O₂），连续通 20 分钟，得到饱和 HbO₂ 溶液。

○ 碳氧血红蛋白百分浓度曲线的制备

管号	1	2	3	4	5	6
饱和 HbCO 溶液（mL）	0	0.25	0.50	1.00	2.00	2.50
饱和 HbO ₂ 溶液（mL）	2.50	2.25	2.00	1.50	0.50	0
试剂四 还原粉剂	1 支	1 支	1 支	1 支	1 支	1 支

混匀，静置 10 分钟后，试剂二调零，1cm 光径，分别测 568nm 与 581nm 的吸光度。

HbCO 百分浓度	0%	10%	20%	40%	80%	100%
ΔOD （ $A_{568}-A_{581}$ ）	0	0.122	0.251	0.481	0.984	1.213



注：根据拟合曲线，得回归方程为 $y = 0.822x + 0.001$

七、计算公式：

○ 碳氧血红蛋白百分浓度（HbCO%）的计算：

通过分别测定 568nm 与 581nm 的吸光度，计算 ΔOD （ $A_{568}-A_{581}$ ）的绝对吸光度值差。再由标准曲线，通过回归方程计算出碳氧血红蛋白百分比浓度，即 HbCO%。

【注 1】如不直接制作百分浓度曲线，也可参照本所提供的百分浓度曲线，回归方程为： $y = 0.822x + 0.001$ ，x 即为 ΔOD （ $A_{568}-A_{581}$ ）的绝对吸光度值，y 即为碳氧血红蛋白百分比浓度，



$$\text{HbCO}\% = [0.822 \times \Delta\text{OD} \quad (A_{568} - A_{581}) + 0.001] \times 100\%$$

【注2】 A_{568} 为 HbCO 吸光度之差最大的波长； A_{581} 为 Hb 吸光度之差为零的波长

○ 血清/血浆中 Hb 的测定步骤及计算公式：

取 0.05mL 样本（血清/血浆）与 2.5mL 的血红蛋白测定应用液（即将试剂五的浓缩液进行 100 倍稀释），混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径蒸馏水调零，波长 540nm 测定各管吸光度值。

血红蛋白含量的计算：

$$\text{血红蛋白克数/升} = 540\text{nm 处吸光度值} \times 73.54$$

○ 血浆中一氧化碳（CO）含量的计算公式：

$$\text{绝对吸光度} \Delta\text{OD 值} = \text{测定管} \Delta\text{OD} (A_{568} - A_{581}) - \text{对照管} \Delta\text{OD} (A_{568} - A_{581})$$

$$\text{通过回归方程计算 HbCO}\% = [0.822 \times \text{绝对吸光度} \Delta\text{OD 值} + 0.001] \times 100\%$$

$$\text{血浆中一氧化碳 (CO) 含量} = \frac{\text{HbCO}\% \times \text{Hb (g/L)} \times 10^6 \times 4}{64456} \quad (\mu\text{mol/L})$$

【注】 64456 为 Hb 分子量； 4 表示一个 Hb 结合四个 CO。