



内源性一氧化碳（CO）测试盒说明书(精简版)

（货号：A101-2-1 测组织 50T/48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×2瓶，4℃保存。

试剂三：碳氧血红蛋白测定粉剂×6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。

试剂六：蛋白测定试剂(考马斯亮蓝)浓缩液30mL×1瓶。临用时按1:4的比例加水稀释后再用。

试剂七：蛋白标准液(0.524g/L)0.1mL×1支，-20℃以下保存。

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、样本前处理：

准确称取组织重量，按重量（g）:体积（mL）=1:9的比例，加入生理盐水或试剂一溶血剂，如果你只测HbCO一个指标则可以用试剂一溶血剂制备成10%的组织匀浆液，如果你同时要测其它的指标则可用生理盐水制备成10%的组织匀浆液，2500转/分，离心10分钟，取上清液，待测。

六、操作步骤：

1、血红蛋白Hb测定及计算：

取0.01mL样本（全血）与2.5mL的100倍稀释的试剂五应用液（血红蛋白测定应用液），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 × 367.7

2、碳氧血红蛋白测定：

①、取经过前处理的样本（经过前处理的组织匀浆上清液）0.2mL，加入试剂三**碳氧血红蛋白Hb测定**

工作液2.3mL，混匀。

②、静置10分钟后，试剂二缓冲液调零，1cm光径，分别测568nm与581nm的吸光度。

3、组织蛋白的测定：

加入物	空白管	标准管	测定管
蒸馏水(mL)	0.05		
标准液(mL)		0.05	
组织匀浆样品(mL)			0.05
考马斯亮蓝应用液(mL)	3	3	3
混匀，室温静置10分钟，波长595nm，光径1cm，蒸馏水调零，测各管OD值。			

4、组织蛋白的计算：

$$\text{组织匀浆蛋白浓度 (g/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times \text{标准液浓度 (0.524g/L)} \times \text{稀释倍数}$$

七、碳氧血红蛋白（HbCO）百分浓度曲线：

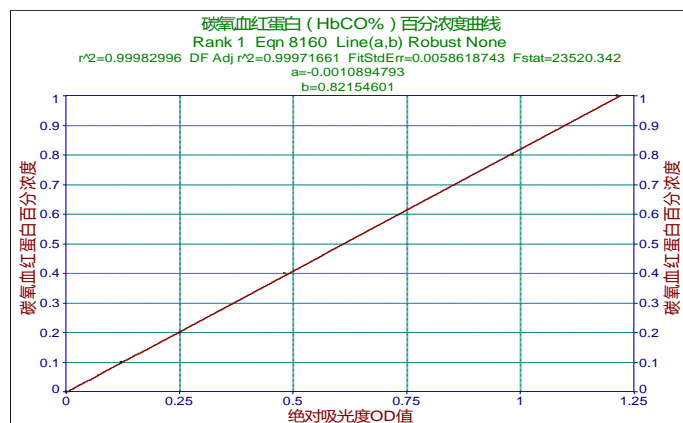
【可自行制作HbCO百分浓度曲线，也可参照本所提供的HbCO百分浓度曲线】

○ 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10 μ L，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，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%
$\Delta OD (A_{568}-A_{581})$	0	0.122	0.251	0.481	0.984	1.213



八、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 $\Delta OD (A_{568}-A_{581})$ 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 $\Delta OD (A_{568} - A_{581})$ 的绝对吸光度值，y 即为碳氧血红蛋白百分比浓度， $HbCO\% = [0.822 \times \Delta OD (A_{568} - A_{581}) + 0.001] \times 100\%$ ；

【注 2】 A_{568} 为 HbCO 吸光度之差最大的波长； A_{581} 为 Hb 吸光度之差为零的两个波长

○ **溶血液中 Hb 的测定步骤及计算公式：**

取 0.01mL 样本（经过前处理的组织匀浆上清液）与 2.5mL 的 100 倍稀释的试剂五应用液（血红蛋白测定应用液），混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径蒸馏水调零，波长 540nm 测定吸光度值。

血红蛋白含量的计算：

血红蛋白克数/升 = 540nm 处吸光度值 \times 367.7

○ **组织中蛋白含量的计算公式：**

组织匀浆蛋白浓度 (g/L) = $\frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times \frac{标准液浓度}{(0.524g/L)} \times 稀释倍数$

○ **组织中一氧化碳 (CO) 含量的计算公式：**

组织中一氧化碳 (CO) 含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $\frac{HbCO\% \times Hb (g/L) \times 10^6 \times 4}{64456} \div \frac{待测样本蛋白浓度}{(gprot/L)}$

【注】 64456 为 Hb 分子量，4 表示一个 Hb 结合四个 CO。