



## 游离血红蛋白（Fhb）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5595

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 16mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 16mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 1mL×1 支	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

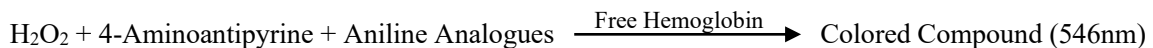
溶液的配制：

1. 工作液：临用前根据样本量按照试剂一：试剂二：试剂三=500μL：500μL：25μL（1.025mL，约 4T）的比例配制工作液，现用现配。
2. 标准品：5mg 血红蛋白，临用前加入 1mL 蒸馏水，充分混匀，配制成 5mg/mL 标准液，2-8°C可保存 4 周。

产品说明：

血管内发生溶血时，红细胞破裂，释放出血红蛋白，血浆中游离血红蛋白（free hemoglobin, Fhb）增多。自身免疫性溶血性贫血、镰刀型细胞贫血、珠蛋白生成障碍性贫血患者血浆Fhb有轻度至中度增加，阵发性睡眠性血红蛋白尿症、阵发性严寒性血红蛋白尿症、不稳定血红蛋白病等会出现血尿症状。因此，血浆中Fhb的测定对于临床诊断溶血性疾病有重要作用。

血红蛋白中的亚铁血红素有类似过氧化物酶的催化活性，能够催化过氧化氢氧化4-氨基安替比林和苯胺类物质，生成紫色化合物，其在546nm有特征吸收峰，其颜色深浅与Fhb含量成正比。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

### 一、样本处理

血浆等液体：直接测定。若有浑浊请离心后取上清置于冰上待测。

### 二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至546nm，可见分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：将5mg/mL（5000mg/L）血红蛋白标准液用蒸馏水进行稀释得到156.25、78.125、39.063、19.531、9.766、4.883mg/L的标准溶液备用。

3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (mg/L)	标准溶液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (mg/L)
1	5000	25	775	156.25
2	156.25	100	100	78.125
3	78.125	100	100	39.063
4	39.063	100	100	19.531
5	19.531	100	100	9.766
6	9.766	100	100	4.883

备注：实验中每个标准管需15μL标准溶液。

4、将工作液37°C预热15min。

5、在微量玻璃比色皿/96孔板中按下表步骤加样：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	15	-	-
样本	-	15	-
标准溶液	-	-	15
工作液	250	250	250

充分混匀，37°C反应5min，测定546nm处吸光值A，分别记为A空白、A测定、A标准，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管和标准曲线只需测定1-2次。

### 三、游离血红蛋白 (FHb) 含量计算

#### 1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x, mg/L) 和吸光度 $\Delta A_{标准}$  (y,  $\Delta A_{标准}$ )，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$  (y,  $\Delta A_{测定}$ ) 带入公式计算样本浓度 (x, mg/L)。

#### 2. FHb含量的计算：

游离血红蛋白 (FHb) 含量 (mg/L) = x × F

F：样本稀释倍数。

#### 注意事项：

- 若测定血浆样本，采样和分离血浆过程中避免发生溶血。
- 若样本测定管吸光值 A 测定 > 1，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 若样本测定管吸光值 A 测定 < 0.01 或接近空白管吸光值，建议将样本加样量增大后再进行测定，空白管和标准管加样量也需进行相应调整。

#### 实验实例：

- 取 15μL 兔血清样本，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算： $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白} = 0.195 - 0.096 = 0.099$ ，根据标准曲线  $y = 0.0056x - 0.03$ ，计算  $x = 23.036$ ，计算 FHb 含量得：  
游离血红蛋白 (FHb) 含量 (mg/L) = x × F = 23.036 mg/L。
- 取 15μL 马血清样本，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算： $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白} = 0.136 - 0.096 = 0.040$ ，根据标准曲线  $y = 0.0056x - 0.03$ ，计算  $x = 12.5$ ，计算 FHb 含量得：  
游离血红蛋白 (FHb) 含量 (mg/L) = x × F = 12.5 mg/L。

#### 参考文献:

[1] Reeder B, Svistunenko D, Cooper C, et al. The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(6): 954-966.

#### 相关系列产品:

- BC1730/BC1735 血清铁浓度检测试剂盒
- BC5410/BC5415 亚铁离子含量检测试剂盒
- BC5580/BC5585 血红蛋白 (Hb) 含量检测试剂盒
- BC5600/BC5605 高铁血红蛋白 (MetHb) 含量检测试剂盒
- BC5610/BC5615 糖化血红蛋白 (GHb) 含量检测试剂盒

