CheKine™ 糖化血红蛋白（GHb）含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB2225　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：抗凝全血
	保质期：4℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

糖化血红蛋白（Glycosylated Hemoglobin，GHb)是人体血液中含有的血红蛋白（Hemoglobin，Hb)的一种，是红细胞中血红蛋白β链上缬氨酸的氨基末端与葡萄糖缓慢、持续且不可逆地进行非酶促蛋白糖化反应的产物。由于人体血液中红细胞的寿命一般约为 120 天，因此糖化血红蛋白含量所反映的是过去 2-3 个月内的平均血糖水平，现已被普遍视为糖尿病患者血糖控制状况的有效评估指标。

本试剂盒检测原理是糖化血红蛋白上的糖在酸性条件下加热，脱水缩合生成 5-羟甲基糠醛（5-HMF），5-HMF 与 TBA（Thiobarbituric Acid，TBA)反应生成有色物质，在 443 nm 处有特征吸收峰。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	10 mL	20 mL	4℃
Reagent Ⅱ	15 mL	30 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	7.5 mL	15 mL	4℃
Reagent Ⅳ	3 mL	6 mL	4℃，避光保存
Standard	1 mL	1 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 400 nm 和 443 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	生理盐水、去离子水	样本制备/检测体系配置用
其他	水浴锅、恒温箱、制冰机、离心机、2 mL 带盖螺旋 EP 管、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃
Reagent Ⅳ	即用型；使用前平衡到室温	4℃，避光保存
Standard	即用型；使用前平衡到室温；10 mg/mL 血红蛋白标准液	4℃，避光保存
0.625 mg/mL Standard	使用前取 10 μL 10 mg/mL 血红蛋白标准液加入 150 μL 去离子水充分混匀	现配现用

05-2 样本制备

注意：1.使用新鲜抗凝全血。若无法及时处理可 4℃保存 48 小时。

2. 使用生理盐水清洗时要轻柔颠倒混匀，避免样本溶血。

3. GHb 的检测至少需要 300 μL 的溶血液。测总血红蛋白时，溶血液推荐稀释 100-300 倍；测 GHb 时，溶血液可不稀释。

- **抗凝全血：**使用新鲜的抗凝全血，4℃ 3000 rpm，离心 10 min，弃上清留下层红细胞。加入 1 mL 生理盐水，缓慢颠倒混匀，4℃ 3000 rpm，离心 10 min，弃上清留下层红细胞。重复加入生理盐水清洗 2 次，得到的沉淀即为红细胞，用于制备溶血样本。分别将红细胞和预冷过的去离子水按照 1：2 的比例混合，充分涡旋混匀得到溶血液。

05-3 实验步骤

05-3-1 总血红蛋白含量检测

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 400 nm。

2. **样本检测体系配制**：空白孔和标准孔只需测定一次，在 96 孔板中按照如下方式操作：

试剂	测定孔（μL）	空白孔 1（μL）	标准孔（μL）
样本	40	0	0
去离子水	0	40	0
0.625 mg/mL Standard	0	0	40
Reagent Ⅰ	160	160	160

3. **吸光度检测**：充分混匀，室温（25℃）静置 5 min，测定 400 nm 处吸光值，测定孔记录为 $A_{总}$，空白孔记录为 $A_{空白1}$，标准孔记录为 $A_{标准}$。

05-3-2 糖化血红蛋白含量检测

注意：1. 加入 Reagent Ⅱ和 Reagent Ⅲ时务必缓慢加入，沸水浴处理过程中注意密封以防止水分散失。

2. 加入 Reagent Ⅲ后反应液会出现凝固的现象，加入后需要快速涡旋混匀。

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 443 nm。

2. **样本检测体系配制**：空白管只需测定一次，在 2 mL 带盖螺旋 EP 管中按照如下方式操作：

试剂	测定管（μL）	空白管 2（μL）
样本	250	0
去离子水	0	250
Reagent Ⅱ	125	125
缓慢加入 Reagent Ⅱ，充分混匀，沸水浴 1 h，冷却至室温		
Reagent Ⅲ	125	125
缓慢加入 Reagent Ⅲ后立即充分混匀，3500 g，室温（25℃）离心 10 min，取上清至 1.5 mL EP 管中		
上清液	200	200
Reagent Ⅳ	50	50

3. 充分混匀，40℃孵育 30 min，冷却至室温后，取 200 μL 反应液于 96 孔板中，测定 443 nm 处吸光值，分别记为 $A_{测定}$、$A_{空白2}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{总}=A_{总}-A_{空白1}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白1}$，$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白2}$。

2. 样本 GHb 含量计算

- 总血红蛋白（Hb）含量计算

总血红蛋白含量（g/mL）$=\Delta A_{总}\div(\Delta A_{标准}\div C_{标准})\times n$**$=6.25\times10^{-4}\times\Delta A_{总}\div\Delta A_{标准}\times n$**

- 糖化血红蛋白（GHb）含量计算

糖化血红蛋白含量以每 10 g 总血红蛋白的吸光值表示。

每 10 g 总血红蛋白吸光值$=\Delta A_{测定}\div(C_{Hb}\div2\times V_{样})\times10\times n$**$=100\times\Delta A_{测定}\div C_{Hb}\times n$**

$C_{标准}$：标准品浓度，0.625 mg/mL=6.25×10^{-4} g/mL；C_{Hb}：样本总血红蛋白含量，g/mL；2：GHb 含量测定步骤样本到上清液的过程稀释了 2 倍；$V_{样}$：GHb 含量测定步骤加入的上清液体积，0.2 mL；10：血红蛋白质量，10 g；n：稀释倍数。

3. 计算结果换算公式：

IFCC-HbA1c (%)**=（每 10 g 总血红蛋白吸光度×0.0005+0.0154）×100%**

IFCC-HbA1c (mmol/mol)**=1300×IFCC-HbA1c (%)÷100-7.4**

DCCT-HbA1c (%)**= [(IFCC-HbA1c (mmol/mol)÷10.929+2.15)÷100]×100%**

07 结果展示

示例-1: (1)猪溶血液用去离子水稀释 100 倍后取 40 μL，按照样本测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $A_{总}$=0.530, $A_{空白1}$=0.042, $A_{标准}$=0.297; $\Delta A_{总}=A_{总}-A_{空白1}$=0.530-0.042=0.488, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白1}$=0.297-0.042=0.255。计算总血红蛋白含量为：总血红蛋白含量（g/mL）$=6.25\times10^{-4}\times\Delta A_{总}\div\Delta A_{标准}\times n$=0.120 g/mL。

(2)取 250 μL 猪溶血液，按照样本测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $A_{测定}$=0.168，$A_{空白2}$=0.041；$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白2}$=0.168-0.041=0.127；每 10 g 血红蛋白吸光值$=100\times\Delta A_{测定}\div C_{Hb}\times n$=105.833，计算结果根据换算公式换算为 IFCC-HbA1c (%)=6.832 %, IFCC-HbA1c (mmol/mol)=81.416 mmol/mol, DCCT-HbA1c (%)=9.600 %。

08 FAQ

- **样本检测得到的ΔA 过高或者过低怎么办?**

若样本总血红蛋白测定吸光值$\Delta A_{总}$大于 1.0 时，建议将待测样本使用去离子水适当稀释后再重新进行测定，计算结果乘以稀释倍数；若总血红蛋白测定吸光值$\Delta A_{总}$小于 0.01 或者接近空白管吸光值时，建议增加样本量，再重新进行测定。

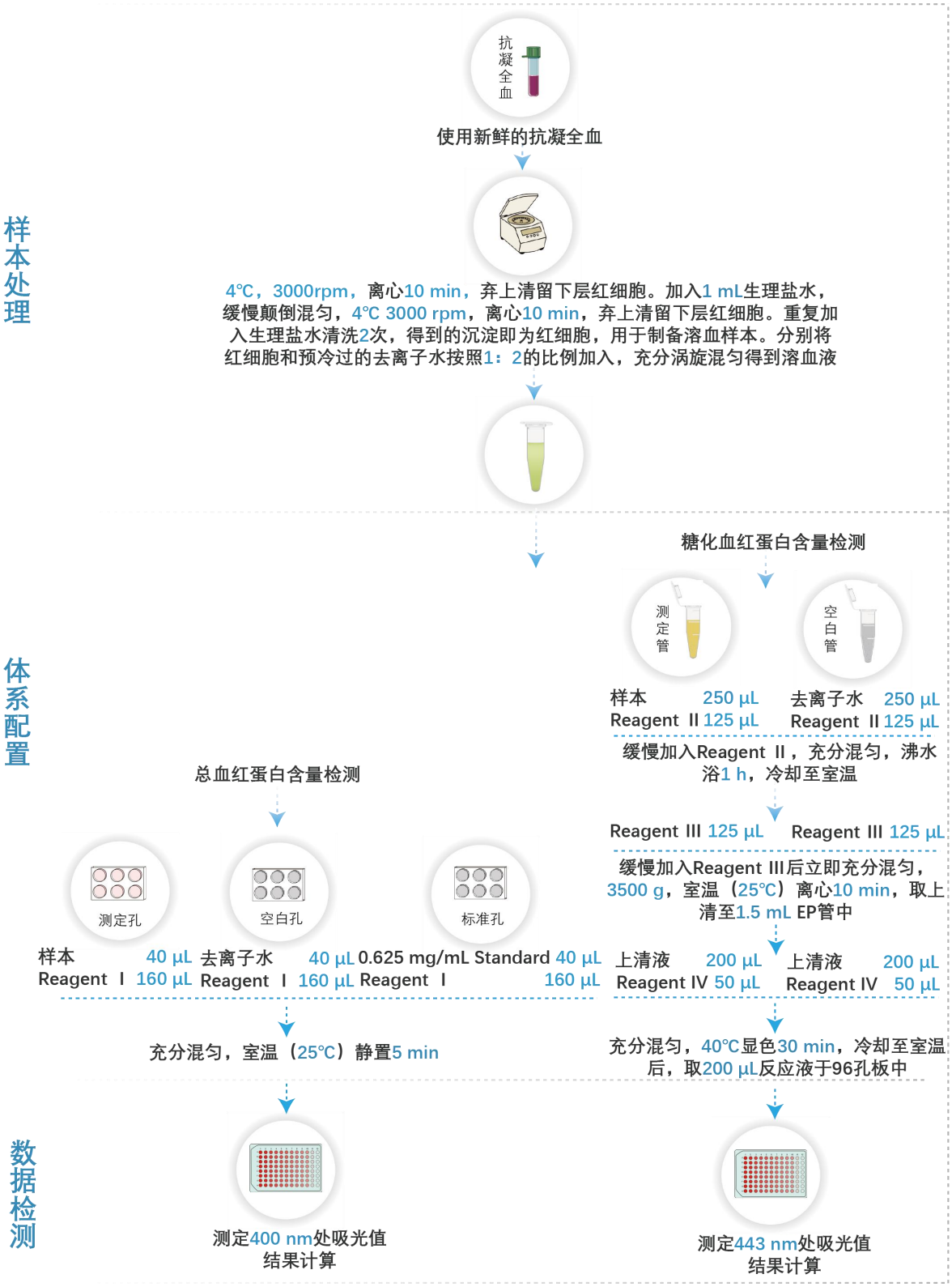
若样本糖化血红蛋白测定吸光值$\Delta A_{测定}$大于 1.0 时，建议将待测样本使用去离子水适当稀释后再重新进行测定，计算结果乘以稀释倍数；若糖化血红蛋白测定吸光值$\Delta A_{测定}$小于 0.01 或者接近空白管吸光值时，建议增加样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB2226	CheKine™ 糖化血清蛋白（GSP）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1330	CheKine™ 血糖含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 糖化血红蛋白（GHb）含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB2225）



V1.0