

髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒

(货号: BC100 比色法 100 管/48 样)

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 缓冲贮备液 35mL×1 瓶, 按需要量配成缓冲应用液, 4℃保存。缓冲应用液的配制: 贮备液:蒸馏水=1:9, 4℃可保存 1 个月。

试剂二: 粉剂×2 瓶, 4℃保存。临用时每支加缓冲应用液 60mL 溶解, 可以 37℃加热溶解, 4℃可保存 2 周。[注]: 若您所需测的是组织样本, 并且除髓过氧化物酶之外, 还需测其它项目时, 此时每支试剂二粉剂需配成浓缩一倍的溶液, 即每支试剂二粉剂加到缓冲应用液 30mL 中。

试剂三: 粉剂×3 支, 溶剂 6mL×3 支, 4℃保存。用时 1 支粉剂倒入 1 支溶剂中溶解, 最好提前一天配制, 溶解后 4℃可保存 2 周。

试剂四: 溶液 24mL×1 瓶, 天冷时会凝固, 用前放入 37℃以上的水中摇晃使其溶解至透明后方可应用, 室温保存。

试剂五: 粉剂×2 支, 4℃保存。

试剂六: 溶液 0.5mL×1 支, 4℃保存。

显色剂的配制: 临用时将试剂五粉剂 1 支加到 100mL 缓冲应用液中, 充分摇匀, 待粉剂完全溶解后再加入试剂六 0.1mL, 充分混匀, 配好后的显色剂 4℃避光保存 (颜色变深红后弃用)。

试剂七: 溶液 6mL×1 瓶, 4℃保存。

二、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿, 蒸馏水, 涡旋混匀器, 37℃及 60℃水浴锅或恒温箱。

三、组织样本的 MPO 测定:

(一)、样本前处理:

(1) **血清 (浆) 样本:** 取血清 (浆) 与试剂二 1:1 混合, 涡旋混匀。

(2) **组织样本:** 准确称取组织重量, 以配好的试剂二溶液为匀浆介质, 按重量体积比为 1:19 加匀浆介质制备成 5%的组织匀浆 (也可酌情制备成 10%的匀浆), 不需要进行离心。(组织匀浆尽量均匀, 不要有大块组织存在) [注]: 若您除做髓过氧化物酶之外, 还需测其它指标时, 则组织匀浆制备可按下面步骤做:

①、试剂二配制时要浓缩一倍, 即每支试剂二粉剂加到 30mL 缓冲应用液中;

②、用生理盐水为匀浆介质制成浓缩一倍的匀浆, 即 10%匀浆 (脑组织制备成 20%匀浆), 不要离心, 取出部分按 1:1 比例加入浓缩一倍的试剂二溶液, 混匀后再进行测定。

(二)、操作表:

	对照管	测定管
处理好的样本 (mL)	0.18	0.18
试剂三 (mL)	0.02	0.02
充分混匀, 37℃水浴 15 分钟		
蒸馏水 (mL)	3	
显色剂 (mL)		3
混匀, 37℃水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.2	0.2

试剂七 (mL)	0.05	0.05
混匀, 60°C水浴 10 分钟, 取出后立即在 460nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管吸光度值。		

[注 1]: 天冷时, 反应液会出现凝固状态, 吸光度上升, 您可以用 25 ~ 37°C 的水浴箱或取一个盛 25 ~ 37°C 热水的烧杯放在比色机旁边, 将各待测管依次放入水浴箱或烧杯中 1 ~ 2 分钟, 待凝固消失后即可进行比色。

[注 2]: 混匀时, 最好用旋涡混匀器, 使液体上下充分混匀 (一定要使最下面液体也能旋转到上面, 建议不要用尖底的管子做, 尤其不可用 1.5mL 的 EP 管, 因为这样非常难混匀)

(三)、血清 (浆) 样本计算:

1、单位定义: 每升血清 (浆) 在 37°C 的反应体系中 H₂O₂ 被分解 1μmol 为 1 个酶活力单位 U。

2、计算公式:

$$\text{MPO活力 (U/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{11.3 \times V_{\text{样}}}$$

V_样: 为取样中所含血清的量 (升), V_样 = 前处理后血清浓度 0.5 (mL/mL) × 加样量 (0.18 × 10⁻³L)

3、计算举例:

取 0.3mL 的血清加 0.3mL 的试剂二充分混匀, 取 0.18mL 做检测, 测得测定管 OD 值 0.053, 对照管 OD 值 0.013, 则计算如下:

$$\text{MPO活力 (U/L)} = \frac{0.053 - 0.013}{11.3 \times 0.5 \times 0.18} \times 1000 = 39.33\text{U/L}$$

(三)、组织样本计算:

1、单位定义: 每克组织湿片在 37°C 的反应体系中 H₂O₂ 被分解 1μmol 为 1 个酶活力单位 U。

2、计算公式: $\text{MPO活力 (U/g湿重)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{11.3 \times W}$

11.3 为斜率的倒数(常数);

W 为样本取样量(g), 且 W = 匀浆液浓度(5%或 10%) × 取样体积(0.18mL)。

3、计算举例:

例 1: 取 5% 的小鼠心肌匀浆 0.18mL 按上述步骤进行检测, 测得对照管吸光度为 0.030, 测定管吸光度为 0.164, 则计算如下:

$$\text{MPO活力 (U/g湿重)} = \frac{0.164 - 0.030}{11.3 \times 0.05 \times 0.18} = 1.317\text{U/g湿重}$$

例 2: 取 5% 的大鼠肝匀浆 0.18mL 按上述步骤进行检测, 测得对照管吸光度为 0.028, 测定管吸光度为 0.183, 则计算如下:

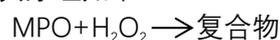
$$\text{MPO活力 (U/g湿重)} = \frac{0.183 - 0.028}{11.3 \times 0.05 \times 0.18} = 1.524\text{U/g湿重}$$

例 3: 取 10% 的大鼠脑匀浆 0.18mL 按上述步骤进行检测, 测得对照管吸光度为 0.002, 测定管吸光度为 0.012, 则计算如下:

$$\text{MPO活力 (U/g湿重)} = \frac{0.012 - 0.002}{11.3 \times 0.1 \times 0.18} = 0.0492\text{U/g湿重}$$

四、测定原理:

中性白细胞中存在有髓过氧化物酶, 每个细胞所含的酶的量是一定的, 约占细胞干重的 5%, 该酶具有使过氧化氢还原的能力, 利用这一特点可以分析酶的活力, 并定量测定中性白细胞的数目。其原理如下:





ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

复合物+AH₂ (供氢体) → H₂O+MPO+A 产物

通过供氢体邻连茴香胺供氢后生成黄色化合物，在 460nm 处通过比色测定 A 产物的生成量，从而推算出 MPO 的活力及 H₂O₂ 减少的量和白细胞的数目。