

髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)活性

规格：分光法 48 样

检测原理：邻联茴香胺法

编号：ml203551

检测波长：450nm

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

髓过氧化物酶 (MPO) 是一种由活化的中性粒细胞、单核-巨噬细胞分泌的白细胞酶，主要存在于中性粒细胞和单核-巨噬细胞的嗜苯胺蓝颗粒中，作为系统炎症和氧化应激的标志物，在免疫和炎症过程中发挥重要作用，并参与抗菌、免疫调节和氧化应激等生理过程。

测定原理：

髓过氧化物酶可催化 H_2O_2 分解, 同时将邻联茴香胺氧化生成有色物质, 产物在 460 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征髓过氧化物酶的活性。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、水浴锅和蒸馏水

试剂的组成：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃保存，临用前加入 30mL 试剂一，可以 37℃加热溶解；

试剂四：液体 2 mL×1 支，4℃避光保存；

试剂五：液体 0.2 mL×1 瓶，4℃保存。

粗酶液提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 试剂三体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂三), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 14000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 试剂二体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂三), 进行冰浴匀浆。14000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、**血清 (浆) 样品:** 按照血清体积(mL): 试剂三体积(mL)为 1: 1 的比例混匀。14000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤和加样表:

1.分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 460nm, 蒸馏水调零。

2.**工作液的配制:** 根据使用量按试剂一: 试剂四: 试剂五=960:40:1 的体积比配制, 充分混匀即为检测工作液。

3.在 1.5mLEP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	35
试剂二	140
工作液	875
混匀, 移至 1mL 比色皿中记录 25°C, 450nm 下的初始吸光值 A1 和 30min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$	

注意: 如果 ΔA 小于 0.02, 可延长反应时间或增加样本量。如果 ΔA 大于 0.5, 可将样本待测液用试剂二稀释后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数。

MPO 活性计算:

1、血清 (浆) MPO 活性

单位定义:每 mL 液体样本每分钟生成 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活单位。

$$\text{MPO (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \div V_{\text{样}} \div \epsilon \div T \div d \div V_{\text{液}}$$

2、组织、细菌或细胞 MPO 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义:每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活单位。

$$\text{MPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div \epsilon \div T \div d \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义:每 g 组织每分钟生成 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活单位。

$$\text{MPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \div V_{\text{样}} \div \epsilon \div T \div d \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义:每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活单位。

$$\text{MPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \div V_{\text{样}} \div \epsilon \div T \div d \div \text{细胞数量}$$

V 反总: 反应体系总体积, 1.05 mL;

V 样: 反应体系中加入粗酶液的体积, 0.035 mL;

V 提: 样品处理得到粗酶液总体积, 1 mL;

V 液: 液体样本提取过程中加入液体样本的体积, mL;

ϵ : 氧化型邻联茴香胺消光系数, 11.3 mL/ $\mu\text{mol/cm}$;

d: 1mL 玻璃比色皿光径, 1 cm;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

细菌或细胞数量, 以万计;

T: 酶促反应时间, 30min。

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。