

髓过氧化物酶活性试剂盒 48 样

规格：微量法 48 样
编号：ml300876

检测原理：邻联茴香胺法
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：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、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 60mL 试剂一，可以 37℃加热溶解；

试剂四：液体 1 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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：试剂三体积(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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 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 稀释 10 倍的试剂一：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 96 孔板中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂二	40
工作液	250
混匀，记录 25℃，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, 0.3 mL;

V 样: 反应体系中加入粗酶液的体积, 0.01 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/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$;

d: 96 孔板光径, 0.5 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。