

髓过氧化物酶活性检测试剂盒48样

规格：微量法 48样

编号：JLC_K14848

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。

试剂的组成和配制

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（10⁴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ΔA = 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1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活单位。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.3 mL；

$V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；

$V_{\text{提}}$ ：样品处理得到粗酶液总体积，1 mL；

$V_{\text{液}}$ ：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 ：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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例