

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0923

Size: 100T/48S

髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒说明书

比色法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、试剂的组成和配制:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	缓冲贮备液 35mL×1 瓶	-	按需要量配成缓冲应用液, 4℃可保存 6 个月。缓冲应用液的配制: 贮备液: 双蒸水=1:9, 4℃可保存 1 个月。
试剂二	粉剂×2 支	4℃	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℃	用时 1 支粉剂倒入 1 支溶剂中溶解, 最好提前一天配制, 充分溶解后 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, 室温可保存 6 个月。
试剂五	粉剂×2 支	4℃	4℃可保存 6 个月
试剂六	溶液 0.5mL×1 支	4℃	4℃可保存 6 个月
<p>显色剂的配制: 临用时将试剂五粉剂支加到 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)。</p>			
试剂七	溶液 6mL×1 瓶	4℃	4℃可保存 6 个月

二、测定步骤：

● 组织样本前处理：

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，则组织匀浆制备要按下面方法：

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、先用生理盐水为匀浆介质按实验方法学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，取出部分浓缩一倍匀浆按 1：1 比例加入浓缩一倍的试剂二溶液，混匀后再进行测定。

● 操作表：

	对照管	测定管
5%组织匀浆 (mL)	0.18	0.18
试剂三 (mL)	0.02	0.02
充分混匀，37°C水浴 15 分钟		
试剂四 (mL)	0.2	0.2
双蒸水 (mL)	3	
显色剂 (mL)		3
混匀，37°C水浴 30 分钟		
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，双蒸水调零，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、计算:

1、单位定义: 每克组织湿片在 37°C 的反应体系中 H_2O_2 被分解 $1\mu\text{mol}$ 为 1 个酶活力单位。

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;

W: 为样本取样量 (g), 且 $W = \text{匀浆液浓度 (5\% 或 10\%)} \times \text{取样体积 (0.18mL)}$ 。

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:

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

● 血清（浆）样本的 MPO 测定：

1. 样本前处理：取血清（浆）与试剂二按 1：1 比例稀释，充分混匀。

2. 操作表：

	试剂空白（可以不做）	对照管	测定管
血清（浆）（mL）		0.18	0.18
试剂三（mL）		0.02	0.02
充分混匀，37°C 水浴 15 分钟			
试剂四（mL）	0.2	0.2	0.2
双蒸水（mL）	0.2	3	
显色剂（mL）	3		3
混匀，37°C 水浴 30 分钟			
试剂七（mL）	0.05	0.05	0.05
混匀，60°C 水浴 10 分钟，取出后立即在 460nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，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）

● 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。

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

$V_{\text{样}}$ ：为取样中所含血清的量（升）， $V_{\text{样}} = \text{前处理后血清浓度 } 0.5 \text{ (mL/mL)} \times \text{加样量 } (0.18 \times 10^{-3} \text{L})$

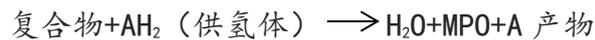
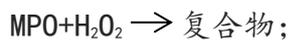
3、计算举例：

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：

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

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：



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。