

髓过氧化物酶(MPO)试剂盒说明书

(货号:ADS-F-QT058 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)是一种含有血红素辅基的血红素蛋白酶,属于血红素过氧化物酶超家族成员,存在于髓系细胞(主要是中性粒细胞和单核细胞)的嗜苯胺蓝颗粒中,是髓细胞的特异性标志。在 MPO 催化下, H_2O_2 发生还原反应,通过供氢体邻联茴香胺供氢,生产黄色化合物,该产物在 460nm 处有最大光吸收,故可通过测 460nm 下吸光值变化测定髓过氧化物酶活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 4mL×1 支	4°C避光保存	
试剂二	液体 36mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 2mL×1 瓶	4°C避光保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.25g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 分光光度计预热 30min 以上(等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 460nm, 蒸馏水调零。
- ② 测定前将试剂解冻至室温(25°C), 试剂一: 试剂二 按照 1:9 混匀制备成反应 mix, 现配现用。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	40
反应 mix	720
试剂三	40
混匀, 立即在 460nm 处读取吸光值 A1, 1 分钟后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 1. 加完试剂三即启动反应, 所以试剂三加完需立即检测, 若 A1 值大于 1 或 ΔA 大于 1, 可降低样本量 V1 (如减

至 20 μ L, 则试剂二相应增加), 或对样本上清液用蒸馏水稀释成合适的稀释倍数后再加样测定, 则改变后 V1 或稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 小于 0.005, 可增加样本量 V1 (如增至 80 μ L, 则反应 mix 相应减少), 或可延长反应时间 T (如延长到 5min 后读取 A2), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

3. 若上升趋势不稳定, 可全部加完稳定几分钟后再读取 A1, 选取一段线性增长范围读取 A2。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟在 25 $^{\circ}$ C 下分解 1 μ mol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{MPO(U/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 11.3 \div T \times D = 2.212 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟在 25 $^{\circ}$ C 下分解 1 μ mol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{MPO(U/min/mg prot)} = \Delta A \div (V1 \times \text{Cpr}) \div 11.3 \div T \times D = 2.212 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟在 25 $^{\circ}$ C 下分解 1 μ mol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{MPO(U/min/mL)} = \Delta A \div V1 \div 11.3 \div T \times D = 2.212 \times \Delta A \times D$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟在 25 $^{\circ}$ C 下分解 1 μ mol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{MPO(U/min/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 11.3 \div T \times D = 0.0044 \times \Delta A \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 1 min;

W---样本质量;

500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

11.3---斜率的倒数

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。