

髓过氧化物酶(MPO)试剂盒说明书

(货号:ADS-W-QT058 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 2mL×1 支	4°C避光保存	
试剂二	液体 18mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 1mL×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)、96孔板、离心管、酶标仪、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 液体样本:直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

- ③ 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。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上(等仪器过自检程序亦可),调节波长至 460nm。
 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 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μ L)	测定管
样本	10
反应 mix	180
试剂三	10
混匀,立即在 460nm 处读取吸光值 A1,1 分钟后读取 A2, $\Delta A=A_2-A_1$ 。	

【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 0.6 或 A2

值大于 1.5 或 ΔA 大于 1, 可降低样本量 V_1 (如减至 $5\mu\text{L}$, 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 V_1 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 V_1 (如增至 $20\mu\text{L}$, 则试剂二相应减少), 或可延长反应时间 T (如延长到 5min 后读取 A_2), 则改变后的 V_1 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 A_1 , 选取一段线性增长范围读取 A_2 。

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°C 下分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 定义为一个酶活力单位 U 。

$$\text{MPO}(U/\text{min}/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V_1 \div V) \div 11.3 \div T \times D = 8.85 \times \Delta A \div W \times D$$

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°C 下分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 定义为一个酶活力单位 U 。

$$\text{MPO}(U/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div 11.3 \div T \times D = 8.85 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟在 25°C 下分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 定义为一个酶活力单位 U 。

$$\text{MPO}(U/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div V_1 \div 11.3 \div T \times D = 8.85 \times \Delta A \times D$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟在 25°C 下分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 定义为一个酶活力单位 U 。

$$\text{MPO}(U/\text{min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div (500 \times V_1 \div V) \div 11.3 \div T \times D = 0.0177 \times \Delta A \times D$$

V ---加入提取液体积, 1 mL ;

V_1 ---加入样本体积, 0.01mL ;

T ---反应时间, 1 min ;

W ---样本质量, g ;

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。