

髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒说明书

(货号: A044-1-1 比色法)

一、试剂组成与配制: (100 管/48 样)

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℃可保存 6 个月。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℃可保存 6 个月。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℃可保存 6 个月。

试剂六: 溶液 0.5mL×1 支, 4℃可保存 6 个月。

显色剂的配制: 临用时将试剂五粉剂 1 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)。

试剂七: 溶液 6mL×1 瓶, 4℃可保存 6 个月。

二、组织样本的 MPO 测定:

(一)、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。

(二)、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℃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℃水浴 30 分钟		
试剂七 (mL)	0.05	0.05
混匀, 60℃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℃的水浴箱或取一个盛 25~37℃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℃的反应体系中 H₂O₂ 被分解 1μmol 为 1 个酶活力单位。

2、计算公式:
$$\text{MPO活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{11.3 \times W}$$

11.3: 为斜率的倒数;

W: 为样本取样量(g), 且 W=匀浆液浓度(5%或 10%)×取样体积(0.18mL)。

三、血清(浆)样本的 MPO 测定:

(一)、样本前处理: 取血清(浆)与试剂二按 1:1 比例稀释, 充分混匀。

(二)、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℃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℃水浴 30 分钟			
试剂七 (mL)	0.05	0.05	0.05
混匀, 60℃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℃的水浴箱或取一个盛 25~37℃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:

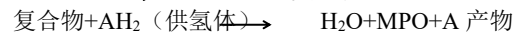
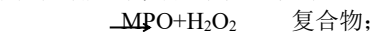
1、单位定义: 每升血清(浆)在 37℃的反应体系中 H₂O₂ 被分解 1μmol 为 1 个酶活力单位。

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

V_样: 取样中所含血清的量(升), V_样=前处理后血清浓度 0.5 (mL/mL) × 加样量 (0.18 × 10⁻³L)

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。