



## 髓过氧化物酶活性检测试剂盒 48 样分光法

规格：分光法 48 样

检测原理：邻联茴香胺法

编号：TW56838

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

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、水浴锅和蒸馏水。

### 试剂的组成

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 30mL 试剂一，可以 37℃加热溶解；

试剂四：液体 2 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（ $10^4$ 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）：试剂二体积(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。

## 测定步骤和加样表

1.分光光度计预热 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 1.5mLEP 管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂二	40
工作液	875
混匀，移至 1mL 比色皿中记录 25℃，450nm 下的初始吸光值 A1 和 30min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$	

**注意：**如果  $\Delta A$  小于 0.02，可延长反应时间或增加样本量。如果  $\Delta A$  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 1  $\mu\text{mol}$  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  $\mu\text{mol}$  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  $\mu\text{mol}$  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  $\mu\text{mol}$  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，1.05 mL；

$V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液的体积，0.035 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；

$\varepsilon$ ：氧化型邻联茴香胺消光系数，11.3 mL/ $\mu\text{mol/cm}$ ；

$d$ ：1mL 玻璃比色皿光径，1 cm；

$\text{Cpr}$ ：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最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。