髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒说明书

比色法　　100 管/48 样

一、试剂组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：缓冲贮备液 35mL×1 瓶，按需要量配成缓冲应用液，4℃保存。**缓冲应用液**的配制：贮备液:蒸馏水=1:9，4℃可保存 1 个月。

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃保存。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℃保存。用时 1 支粉剂倒入 1 支溶剂中溶解，最好提前一天配制，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，室温保存。

试剂五：粉剂×2 支，　4℃保存。

试剂六：溶液 0.5mL×1 支，4℃保存。

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℃保存。

二、所需仪器及试剂：

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿，蒸馏水，涡旋混匀器，37℃及 60℃水浴锅或恒温箱。

三、组织样本的 MPO 测定：

（一）、样本前处理：

（1）血清（浆）样本：取血清（浆）与试剂二 1:1 混合，涡旋混匀。

（2）组织样本：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，则组织匀浆制备可按下面步骤做：**

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、用生理盐水为匀浆介质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
处理好的样本（mL）	0.18	0.18
试剂三（mL）	0.02	0.02
充分混匀，37℃水浴 15 分钟		
蒸馏水（mL）	3	
显色剂（mL）		3
混匀，37℃水浴 30 分钟		
试剂四（mL）	0.2	0.2
混匀，60℃水浴 10 分钟，取出后立即在 460nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，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）、血清（浆）样本计算：

1、单位定义：每升血清（浆）在 37℃的反应体系中 H_2O_2 被分解 1μmol 为 1 个酶活力单位 U。

2、计算公式：

$$\text{MPO活力（U/L）} = \frac{A_{测定} - A_{对照}}{11.3 \times V_{样}}$$

$V_{样}$：为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^{-3}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：

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

（三）、组织样本计算：

1、单位定义：每克组织湿片在 37℃的反应体系中 H_2O_2 被分解 1μmol 为 1 个酶活力单位 U。

2、计算公式：

$$\text{MPO活力（U/g湿重）} = \frac{A_{测定} - A_{对照}}{11.3 \times W}$$

11.3 为斜率的倒数(常数);

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

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：

$$\text{MPO活力（U/g湿重）} = \frac{0.164-0.030}{11.3\times0.05\times0.18} = 1.317\text{U/g湿重}$$

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：

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

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：

$$MPO+H_2O_2 \longrightarrow \text{复合物}$$

$$\text{复合物}+AH_2\text{（供氢体）} \longrightarrow H_2O+MPO+A\text{ 产物}$$

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 H_2O_2 减少的量和白细胞的数目。