

髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒说明书

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

