碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

碧云天网站 微信公众号

Human Myeloperoxidase ELISA Kit

产品编号	产品名称	包装
PM574	Human Myeloperoxidase ELISA Kit	96次

产品简介：

- 碧云天的Human Myeloperoxidase ELISA Kit (Human Myeloperoxidase Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit)，即人髓过氧化物酶酶联免疫吸附检测试剂盒，是一种用于特异性地高灵敏地定量检测人血清、血浆中的Myeloperoxidase的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高，特异性强，重复性好。多次重复检测结果表明，最小检出量为1.1ng/ml，与人的COX1、Glutathione Peroxidase、HMW Kininogen、Integrin β2等没有交叉反应，板内、板间变异系数均小于10%。
- 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)是一种重要的含血红素的过氧化物酶(heme-containing peroxidase)，属于过氧化物酶XPO亚家族。MPO存在于髓系细胞(主要是中性粒细胞和单核细胞)的嗜天青颗粒中，可催化过氧化氢(H_2O_2)依赖的次氯酸(HOCl)和其它活性物质的形成，这些化合物与大分子的反应导致酪氨酸残基、脂质和胆固醇的亚硝化、氯化和氧化，以及蛋白质和DNA的分子间交联。MPO作为一种前蛋白被合成，经过蛋白质水解去除了48个氨基酸的信号肽、116个氨基酸的前肽、C末端丝氨酸和6个氨基酸的内部肽，得到了长度分别为60kDa和12kDa的重链和轻链。MPO的其它翻译后修饰包括血红素部分的插入、糖基化和甘露糖残基的磷酸化。活化的MPO是一种二硫键连接的四聚体，含有两个血红素基团以及重链和轻链各两个拷贝。成熟的人MPO与小鼠和大鼠MPO有87-88%的氨基酸序列同源性。
- MPO结合白蛋白(albumin)、巨噬细胞甘露糖受体(mannose receptor)、血管内皮细胞上的细胞角蛋白1 (cytokeratin 1)、高分子量激肽原(kininogen)和中性粒细胞上的整合素CD11b/CD18。这些相互作用促进MPO的清除，一氧化氮和缓激肽(bradykinin)水平的降低，减少血管舒张，持续活化中性粒细胞。MPO基因的表达受甲状腺激素(thyroid hormone)、维甲酸(retinoic acid)、雌激素和PPARγ受体的调控。MPO基因启动子的多态性增加了类固醇反应性，并与多种疾病的发展或严重程度有关。
- 中性粒细胞的MPO储存于细胞质中的嗜苯胺蓝颗粒中，在细胞活化和脱粒(degranulation)后，MPO被输送至吞噬体(phagosomes)，在那里它是杀死被吞噬细菌所必需的物质。活化的中性粒细胞也在细胞外释放颗粒物。血浆MPO水平升高与多种疾病相关，包括全身性炎症、子痫(eclampsia)、血管内皮功能障碍、多发性硬化和氧化应激等。MPO水平在关节炎滑液和牙龈炎龈沟液中亦有升高。此外，MPO水平与动脉粥样硬化斑块和肾结石相关，被视为炎症或损伤组织中性粒细胞浸润的指标。
- 本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法(Sandwich ELISA)检测样品中人MPO的浓度，其原理见图1。人MPO特异的单克隆捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标准品或样品时，其中的人MPO会与捕获抗体结合。当加入辣根过氧化物酶标记抗人MPO抗体后，辣根过氧化物酶标记抗人MPO抗体与人MPO结合，形成夹心的免疫复合物。最后加入显色剂TMB溶液，固相捕获的辣根过氧化物酶就会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质，在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测450nm处的吸光度值就能实现定量检测。人MPO浓度与A450值呈正比，通过绘制标准曲线，对照样品吸光度值，即可计算出样品中靶蛋白浓度。

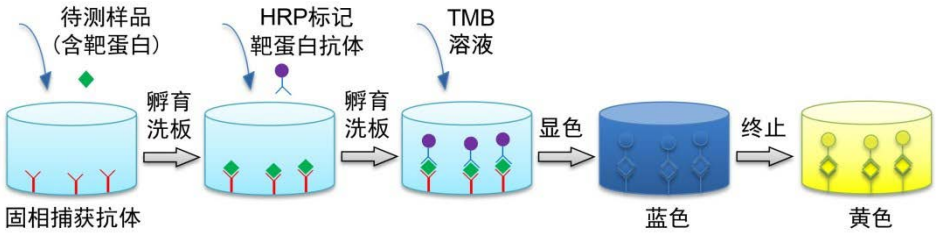

图1. 双抗体夹心ELISA原理图。

- 一个包装的本试剂盒，包括标准品检测，可以进行96次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
PM574-1	人MPO抗体预包被板	8孔×12条
PM574-2	标准品稀释液	10ml
PM574-3	人MPO标准品	2-4瓶
PM574-4	辣根过氧化物酶标记抗人MPO抗体	10ml
PM574-5	洗涤液(20X)	30ml

PM574-6	TMB溶液	10ml
PM574-7	终止液	5ml
PM574-8	封板膜(透明)	2张
PM574-9	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

保存条件：

标准品4°C保存，1-2周内有效，-20°C保存6个月内有效，试剂盒其它组分4°C保存6个月内有效。除标准品外，试剂盒其它组分严禁冻存。

注意事项：

- 由于标准品一般是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶，如果发现有结晶，请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
- TMB溶液请勿接触氧化剂和金属，否则容易失效。
- 加样时，请注意每个样品或标准品必须更换枪头，一方面避免交叉污染，另一方面也避免吸取体积的误差。
- 由于本试剂盒均经过独立测试，所以请勿混用不同货号和不同批次的试剂盒组分，即使是同种试剂盒不同批次的试剂盒组分也不能混用。多个试剂盒同时检测时，请独立使用各个试剂盒中的试剂，请勿使用不同试剂盒中相同名称的组分。
- 充分混匀对保证反应结果的精准性很重要，在加液后请轻轻晃动整个96孔板，以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行，要求严格控制室温在25-28°C。温度低于25°C会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品准备

a. 样品的准备请按下列流程进行操作：
   (a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500×g，5分钟)。
   (b) 对于血清样品，将全血在室温下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。
   (c) 对于血浆样品，采集的全血建议使用EDTA进行抗凝处理，混匀后置冰上，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。
   (d) 若待测样品不能及时检测，样品制备后请分装，冻存于-20°C或-80°C，并注意避免反复冻融。

b. 血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。

c. 样品应清澈透明，检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。

d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测，否则结果将不准确。

e. 因MPO容易降解，收集血清和检测加样时建议加入抑肽酶Aprotinin (5μg/ml) (SG2004, P4233)。

2. 检测前准备工作

a. 试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28°C)平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时置于4°C保存。

b. 配制适当量的洗涤液：将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。

c. 按标准品标签上标注的体积加入标准品稀释液至1瓶标准品中，室温孵育15分钟(为确保标准曲线的准确性，切勿缩短孵育时间)。随后轻轻混匀并用移液枪吹打几次使标准品彻底溶解，使标准品终浓度达到100ng/ml。通常每个浓度的标准品需要检测2个孔，每个孔的标准品用量为100μl，共需200μl，同时稀释时还需要使用250μl，因此如果1瓶标准品配制后的体积不足0.45ml，请使用更多瓶数的标准品，并在合并混匀后使用。

d. 取5个洁净的1.5毫升离心管，每管预先加入250μl的标准品稀释液，并参考图2进行标准品的倍比稀释，最终得到100、50、25、12.5、6.25、3.125ng/ml共六个标准品浓度，最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中，标准品稀释液直接加入作为0ng/ml浓度，共七个标准品浓度。

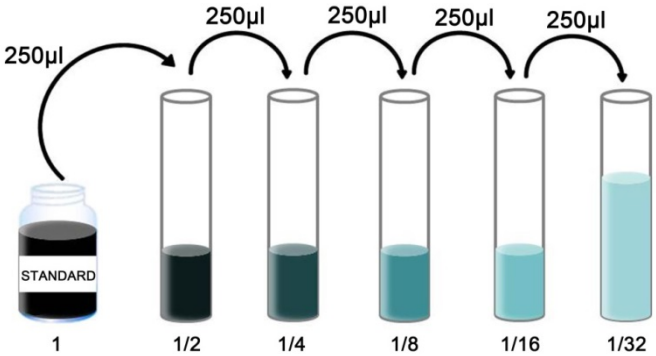

图2. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板：每孔洗涤液为300μl，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

4. 实验过程需自备的材料和仪器

a. 不同规格的移液枪及相应的吸头
b. 酶标仪
c. 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
d. 去离子水或双蒸水

5. 操作步骤

a. 计算并确定一次实验所需的预包被板条数，取出所需板条放置在96孔框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4°C。
b. 每次实验都需配制标准品并绘制出标准曲线，同时建议设置本底较正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
c. 分别将样品或不同浓度标准品按照100μl/孔加入相应孔中，用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育120分钟。不同样本中MPO含量不一样，一般来说，血清样本可稀释2倍检测；血浆样本含量低，无需稀释；唾液样本一般稀释5倍检测。如果样品浓度过高，超出检测范围，请先加入50μl样品分析缓冲液，再加入50μl稀释后的样品。请注意记录好样品的稀释倍数。
注：请先查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度，请适当稀释或浓缩后再进行检测。
d. 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
e. 加入辣根过氧化物酶标记抗人MPO抗体100μl/孔(注：此辣根过氧化物酶标记抗人MPO抗体已经预先配制好，可以直接使用，不必再进行稀释)。用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育60分钟。
f. 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
g. 加入显色剂TMB溶液100μl/孔，用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育15-20分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间，此时可以孵育至标准品和样品出现非常显著的颜色变化。
h. 加入终止液50μl/孔，混匀后立即测量A450值。

6. 结果分析

a. 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效，复孔平均值可作为测量值。
b. 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔，则不需要减去)。
c. 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标，A450值为纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

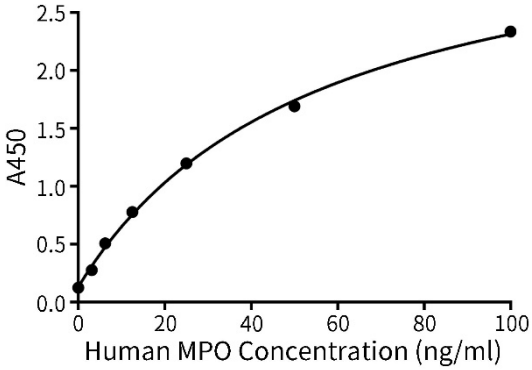

图3. Human MPO ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

d. 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
AF7494	MPO Rabbit Polyclonal Antibody	50μl
PM574	Human Myeloperoxidase ELISA Kit	96次

Version 2023.03.01