

髓过氧化物酶定量检测试剂盒（酶联免疫法）V6.0

即用

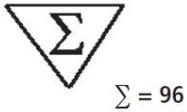
10-1176-01

96 人份试剂



由瑞典 Mercodia AB 制造

用于标签上的标识的说明

	96 测试试剂
	失效日期
	在 2-8℃ 下储存
	批号
	用于体外诊断

预期用途

髓过氧化物的酶定量检测试剂盒（酶联免疫法）用于人血清或血浆样本中髓过氧化物酶的体外定量测定。

本试验的综述和说明

髓过氧化物酶（MPO），一种含铁糖蛋白，是分子量为 150kDa 的共价结合的四聚体复合物。它由两个糖基化的 α 链（分子量 59-64kDa）和两个非糖基化的 β 链（分子量 14kDa）组成。在中性粒细胞原发性嗜天青颗粒和单核细胞发现有大量的 MPO 存在。

作为对微生物侵入的应答，MPO 从中性粒细胞的细胞质颗粒释放到吞噬泡和胞外空间中，催化过氧化氢和氯离子转化为次氯酸（一种强氧化剂）。

髓过氧化物酶（MPO）习惯上用于由哮喘或环境刺激引起的气道炎症的标志物。也有人认为 MPO 颗粒参与动脉粥样硬化的不同阶段，并且在动脉粥样硬化的形成中具有潜在作用。血清中 MPO 水平的升高和心血管疾病（CAD）的联系表明了 MPO 作为 CAD 炎症标记物的重要角色，用于识别病人除心肌梗死以外其它心脏疾病的风险性。

检测程序的原理

髓过氧化物酶检测试剂盒（酶联免疫法）是一种固相双表位酶联免疫分析试剂。它基于双夹心技术，两个单克隆抗体分别结合在 MPO 分子的抗原决定簇上。在孵育过程中，样本中的 MPO 与结合在微孔(板)中的抗-MPO 抗体反应。经洗涤后，加入（辣根）过氧化物酶标记(偶联)的抗-MPO 抗体，经过第二次孵育和一个简单的洗涤步骤，移去了未结合的酶标记抗体，结合的偶联物(标记物)通过与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）反应而被检测到。加入酸后反应终止，然后通过分光光度计（酶标仪）读取反应的终点。

警告和注意事项

- 用于体外诊断。
- 北美地区：仅用于科研，不能用于诊断。
- 不能用于人类或动物的内服或外用。
- 不能让反刍动物或猪接触到本试剂盒的内容物及其残余物。
- 本试剂盒的终止溶液含有 0.5M 的硫酸。按常规预防措施处理危险化学品。
- 所有的患者样本都应按潜在传染物处理。

要求但未提供的材料

- 25 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 移液管（重复移取加入酶结合物溶液、TMB 底物和终止溶液）

- 用于试剂制备的烧杯和量筒
- 重蒸水
- 酶标仪（含 450nm 滤光片）
- 平板振荡器（建议速率 700-900 循环/分钟，轨道运动）
- 微孔板（酶标板）洗涤设备

试剂

每个 Mercodia 的髓过氧化物酶检测试剂盒（酶联免疫法）都包含 96 孔的试剂，足够用于双份测试的 42 个样本、2 个质控和 1 个校准曲线。对于更大量的试验，用标有相同批号的包装中试剂。完整的试剂盒的失效日期在外包装上。建议储存温度为 2-8℃。

包被微孔板	1 个平板	96 孔	准备好使用
鼠 MPO 单克隆抗体		8 孔的条	
对于未使用过的微板条，用胶带重新密封在袋子里，储存在 2-8℃，在 8 周内使用。			
校准品 1、2、3、4、5	5 瓶	1000μL	冻干
人氧化 LDL 黄色			每瓶加入 1000μL 重蒸水
浓度标示在瓶标签上			
重冻干后储存：2-8℃一周			
对于储存超过 1 周的重悬校准品，储存在-20℃			
校准品 0	1 瓶	1000μL	准备好使用
黄色			
样品缓冲液	1 瓶	12mL	准备好使用
黄色			
试验缓冲液	1 瓶	12mL	准备好使用
红色			
酶结合物 11×	1 瓶	1.3mL	制备，见下文
过氧化物酶结合的小鼠单克隆抗体			
酶结合物缓冲液	1 瓶	13mL	准备好使用
蓝色			

洗涤缓冲液 21×	1 瓶	50mL	用 1000mL 重蒸水稀释后储存：2-8℃ 八周	用 1000mL 重蒸水稀释，制作洗涤缓冲液 1×溶液
底物 TMB	1 瓶	22mL	无色溶液 注意！光敏！	准备好使用
终止溶液	1 瓶	7mL	0.5M 硫酸	准备好使用

酶结合物 1×溶液的制备

按下表，用酶结合物缓冲液稀释酶结合物 11× (1+10)，来制备所需体积的酶结合物 1×溶液。当为整个平板制备酶结合物 1×溶液时，将所有酶结合物缓冲液倒入酶结合物 11×瓶中，轻柔混合。

条数量	校准曲线	可重复样品数	酶结合物 11×	酶结合物缓冲液
12 条	1	42	1 瓶	1 瓶
8 条	1	26	700μL	7.0mL
6 条	1	18	500μL	5.0mL
4 条	1	10	350μL	3.5.mL

稀释后储存：2-8℃ 半个月

样本的收集和处理

预分析处理条件的一个重要的考虑因素是预防样本中性粒细胞 MPO 的人工释放，其可能会导致错误增加的值。特别重要的是 MPO 作为潜在的心血管疾病标志物，已报道循环中 MPO 浓度升高与患冠心病的风险增加有关，急性冠脉综合症患者风险的增加和心力衰竭的鉴定和预识的临床作用。中性粒细胞释放 MPO 的体外诊断表明肝素血浆、柠檬酸盐血浆和血清 MPO 的高浓度，室温收集，增加量随时间变化。

进行 MPO 检测时，建议采用肝素化血浆，因为检验值不能模糊，体内中性粒细胞释放 MPO 不可控，因此能够更准确反应循环中 MPO 的浓度。

EDTA-血浆

MPO 检测时建议使用 EDTA-血浆。通过静脉穿刺将血液收集在含 EDTA 或肝素抗凝剂的试管里，分离血浆成分。EDTA-血浆样本室温放置 1h 后，再离心（1500 rpm,10min），分离后的血浆样本可以直接分析或冷冻保存再分析。

血清、肝素血浆、柠檬酸盐血浆

血清、肝素血浆、柠檬酸盐血浆可能都用于试验。血清或含有抗凝剂肝素和柠檬酸对本身分析的检测没有影响，但是，必须要考虑预分析处理可能影响评估结果。

存储

EDTA-血浆样本室温放置 1h 后，再离心（1500 rpm,10min），离后的血浆样本可以直接分析或-20 °C 冷冻保存再分析。

样本的稀释

通常，样本 5 倍稀释再分析（50 μ L+200 μ L 样本缓冲液）

检测步骤

在使用前，所有的试剂和样本都应放至室温。

每次试验都要做一个标准曲线。

1. 向每瓶中加入 1000 μ L 重蒸水来重新溶解校准品 1-5。
2. 准备酶结合物 1 \times 溶液、洗涤缓冲液 1 \times 溶液和样本。
3. 准备足够平行测试 2 次的校准品和样本的微孔(板)。
4. 吸取 25 μ L 各水平校准品和样本到适当的孔中。
5. 向各孔中加入 100 μ L 试验缓冲液。
6. 将上述微孔板放入平板振荡器（700-900rpm）在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）孵育 1 小时。
7. 用带有 overflow 洗涤功能的全自动洗板机，每孔用 700 μ L 洗涤缓冲液 1 \times 溶液洗涤 6 次。在最后一次洗涤后，倒转于吸水纸上并轻拍平板。在洗涤程序中不包括浸泡步骤。

或手工洗涤：

将微孔板倒置在一个水槽上以弃去反应溶液。向每孔加入 350 μ L 洗涤缓冲液 1 \times 溶液。

弃去洗涤溶液，靠在吸水纸紧紧的拍数次以除去多余的液体。重复 5 次。在洗涤过程中避免长时间浸泡。

8. 向每孔中加入 100 μ L 酶结合物 1 \times 溶液。
9. 放入平板振荡器在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）培养 1 小时。

10. 按上述方法洗涤。
11. 向每孔中加入 200 μ L 底物 TMB。
12. 在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）培养 15 分钟。
13. 加入 50 μ L 终止溶液。

将平板放入振荡器 5 秒以确保混匀。

14. 在 450nm 下读取光密度值并计算结果。

在 30 分钟内读数。

注意！防止结合物和底物之间的污染，建议单独使用移液器。

注意！防止结合物和底物之间的污染，建议单独使用移液器。

内部质量控制

对于商品质控品和/或含有低、中和高浓度 MPO 的内部血清，应该像检测样本一样进行日常检测，并每天记录结果。对各试验的以下数据进行记录是良好的实验室规范：试剂盒批号、试剂盒组分稀释液和/或重悬日期、空白、校准品和质控品的 OD 值。

结果的计算

注意：校准品 0（空白）不用于校准曲线的计算。

计算机计算

对于未知浓度的 MPO 样本应使用计算机进行数据简化，由计算机数据获得由校准品 1-5 的 MPO 浓度，对三次样条回归而得的浓度。将样本浓度乘以稀释因子（如 $\times 5$ ）。

人工计算

1. 对除校准品 0 以外的校准品的吸收值，相对于 MPO 浓度，绘制 log-log 图，并创建一个校准曲线。
2. 在校准曲线上读取未知样本的浓度。
3. 将 MPO 的浓度值乘以稀释因子（如 $\times 5$ ）。

结果示例

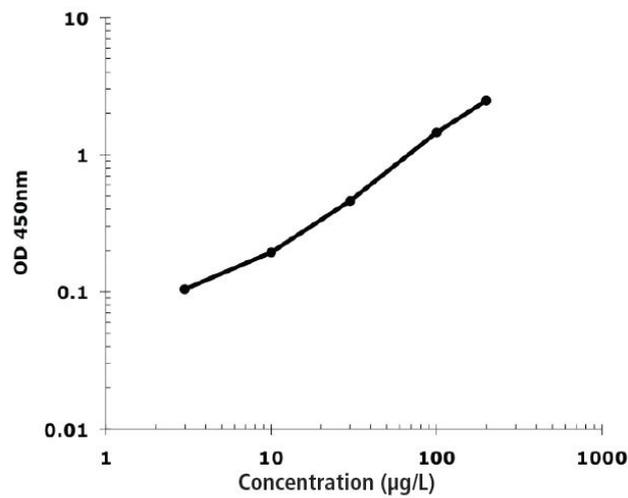
孔	样本	A _{450nm}	浓度µg/L
1A-B	校准品 0	0.066/0.062	
2C-D	校准品 1*	0.101/0.108	
3E-F	校准品 2*	0.195/0.193	
4G-H	校准品 3*	0.453/468	
2A-B	校准品 4*	1.479/1.422	
2C-D	校准品 5*	2.471/2.476	
2E-F	样本 1	0.265/0.260	76
2G-H	样本 2	0.817/0.821	272
3A-B	样本 3	1.582/1.591	548

*瓶标签上显示的浓度

**乘以稀释因子 (×5) 后的结果

校准曲线示例

典型的校准曲线如下所示。不要使用本曲线来确定实际试验结果。



程序的局限性

正如所有的诊断测试，一个确定的诊断不能仅基于单一的测试结果，而是由医生在所有临床发现评估后做出。

高血脂、黄疸或溶血样本不会对本试验造成影响。

期望值

良好的规范决定了每个实验室要建立他们自己的期望值范围。

性能指标

检测限

检出限是按照 ISO11843 第 1 部分检测能力来确定的。检测能力应被视为试验方法确证的一部分，而不是能够检测到的最低浓度。

按照 ISO11843 第 4 部分所述的方法，确定了检出限是 $\leq 3\mu\text{g/L}$ 。

吸收值低于校准品 1 的样本浓度不需计算，但应表述为小于或等于 (\leq) 校准品 1 瓶子上标示的浓度值。

钩状效应

样本浓度大于 $30\ 000\mu\text{g/L}$ 都可检测出来，不出现假低的结果。

回收率

加入的回收率为 85-96% (平均值为 89%)

稀释的回收率为 97-108% (平均值 101%)

精密度

精密度由对来自 33 个不同地点的三个样本进行 4 个重复试验所得。

样本	实测值		变异系数%	
	$\mu\text{g/L}$	批内	批间	总体
1	11.58	4.4	9.7	9.9
2	34.93	3.0	8.5	8.6
3	119.21	3.1	5.3	5.5

特异性

如下为已知的交叉反应：

TPO	$\leq 0.01\%$
CRP	$\leq 0.01\%$
EPO	3.53%
Lpsosyme	0.03%
Elastase	0.12%
Alpha-1-antitrypsin	$\leq 0.01\%$

校准

目前尚没有国际参考品。Merco[®]dia 的髓过氧化物酶检测试剂盒（酶联免疫法）用实验室内部参考控制程序来确定相对独立的单位来校准。

保证

在此发布的性能数据是按指定的程序操作获得的。任何非 Merco[®]dia AB 建议的对程序的变更或修改都可能会影响试验结果，在这种情况下，Merco[®]dia AB 会放弃所有明示的、隐含的或法定的保证，包括使用的适销性或适合性的隐含的保证。

在这种事件中，Merco[®]dia AB 及其授权分销商，不对直接的或间接的损害负责。

参考文献

- Baldus S. et al. (2003) Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 108:1440-1445
- Brennan M-L. et al. (2003) Prognostic value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain. *The New England Journal of Medicine* 349:1595-1604
- Carr A C. et al. (2000) Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1716-1723
- Hazen S L. et al. (1999) Formation of Nitric Oxide-Derived Oxidants by Myeloperoxidase in Monocytes. *Circ. Res.* 85:950-958
- Nambi V. (2005) The Use of Myeloperoxidase As a Risk marker for Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 7:127-131
- Zhang R. et al. (2001) Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA.* 286:2136-2142
- Klebanoff SJ. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598-625
- Scheffer PG. et al. (2009) Myeloperoxidase concentrations in EDTA-plasma of healthy subjects are discordant with concentration in heparin-plasma and serum. *Clin Biochem* 42:149-1492
- Shih J. et al. (2008) Effect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations. *Clin Chem* 54:6 1076-1079
- Schindhelm RK. et al (2009) Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem Aug;55(8):1462-70.* 5.

方案概要表

髓过氧化物酶 ELISA 试剂盒

加入校准品和样本	25 μ L
加入试验缓冲液	100 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下用平板振荡器振荡 2 小时
用洗涤缓冲液洗涤平板	6 次
加入酶结合物溶液	100 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下用平板振荡器振荡 1 小时
用洗涤缓冲液洗涤平板	6 次
加入底物 TMB	200 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下 15 分钟
加入终止溶液	50 μ L 振荡 5 秒钟以确保混匀
在 A450 下测量	评估结果

31-3154

Version 6.0