

溶菌酶 (LYS/LZM) 检测试剂盒说明书

(货号: G1207W 微板法 96 样)

一、产品简介:

溶菌酶又叫胞壁质酶或 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶。能催化某些细菌细胞壁多糖的水解, 从而溶解这些细菌的细胞壁, 起到杀死细菌的作用。

溶菌酶可使一定浓度的浑浊菌液降解, 使浊度降低, 透光度增加, 可通过光度变化来测定溶菌酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×4 支	4℃干燥保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 试剂一涡旋振荡, 至全部溶解备用 (可分装后至-20℃保存, 防止反复冻融)。
标准品	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、水浴锅/恒温培养箱、离心机、蒸馏水。

四、溶菌酶 (LYS/LZM) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 液体样本: 澄清的液体直接检测, 若浑浊则离心后取上清液检测。
- ② 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

- ③ 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min, 设定温度 37℃, 设定波长到 530nm。
- ② 标准品制备: 临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.5mL 蒸馏水充分溶解 (剩余试剂可分装后至-20℃保存, 防止反复冻融), 再用蒸馏水稀释 200 倍 (即 1:199), 最终为 400U/mL=20μg/mL。
- ③ 所有试剂在 37℃条件下孵育 5min, 在 96 孔板中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)
样本	20	
标准品		20
试剂一	180	180
试剂二	20	20
混匀, 于 37°C 条件下反应, 30s 于 530nm 读取吸光值 A1, 10min30s 时再读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。		

【注】: 1. 加完试剂二反应即开始, 若是批量检测, 建议加完样本后, 用排枪加试剂二, 避免加样时间造成测定误差或者分批测定样本。

2. 若 A2 的值小于 0.2, 可对样本用蒸馏水稀释后再测定。稀释倍数 D 代入公式计算。

3. 若测定管的 ΔA 小于 0.005, 可增加样本上清液体积 V2 (如增至 50μL, 则试剂一相应减少), 则改变后的 V2 代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按照体积计算:

溶菌酶含量(μg/mL) = $C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D = 20 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D$

溶菌酶含量(U/mL) = $C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D = 400 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D$

2、按样本鲜重计算:

溶菌酶含量(μg/g) = $(C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (W \times V2 \div V)$
 $= 20 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div W \times D$

溶菌酶含量(U/g) = $(C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (W \times V2 \div V)$
 $= 400 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div W \times D$

3、按样本蛋白浓度计算:

溶菌酶含量(μg/mg prot) = $(C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (Cpr \times V2 \div V)$
 $= 20 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div Cpr \times D$

溶菌酶含量(U/mg prot) = $(C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (Cpr \times V2 \div V)$
 $= 400 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div Cpr \times D$

4、按细菌/细胞数量计算:

溶菌酶含量(μg/10⁴ cell) = $(C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (500 \times V2 \div V)$
 $= 20 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div 500 \times D$

溶菌酶含量(U/10⁴ cell) = $(C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (500 \times V2 \div V)$
 $= 400 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div 500 \times D$

C 标准---标品浓度, 400U/mL, 即 20μg/mL; V1---标准品加样体积, 20μL=0.02mL;

V2---样本加样体积, 20μL=0.02mL; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

V---提取液, 1mL; W---取样质量, g; 500---细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。