

溶菌酶（LZM）检测试剂盒说明书

（货号：BP10138F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 4 支	4℃干燥 避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底； 2. 加 0.6ml 试剂一，溶解备用； 3. 用不完可-20℃分装保存，禁止反复冻融； 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 2 支	-20℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- ① 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。

- ② 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。

- 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 打开分光光度计，设置温度 37℃（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节波长到 530nm，蒸馏水调零。

- 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 200U/mL=10μg/mL。

- ③ 所有试剂在 37℃条件下孵育 5min。在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)
样本	50	
标准品		50
试剂一	650	650
试剂二	40	40
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, 建议逐个测定样本。

2. 若 A2 的值小于 0.1, 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 100μL, 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、按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量}(\mu\text{g/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (W \times V2 \div V) \\ &= 10 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量}(\text{U/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (W \times V2 \div V) \\ &= 200 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div W \times D \end{aligned}$$

2、按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (Cpr \times V2 \div V) \\ &= 10 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div Cpr \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量}(\text{U/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (Cpr \times V2 \div V) \\ &= 200 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\text{溶菌酶含量}(\mu\text{g/mL}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D = 10 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D$$

$$\text{溶菌酶含量}(\text{U/mL}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D = 200 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (500 \times V2 \div V) \\ &= 10 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div 500 \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量}(\text{U}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (500 \times V2 \div V) \\ &= 200 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div 500 \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度, 200U/mL, 即 10μg/mL; V1---标准品加样体积, 20μL=0.05mL;

V2---样本加样体积, 20μL=0.05mL; 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。