

溶菌酶（LYS/LZM）检测试剂盒说明书

(货号: BP10138W 微板法 96 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 4 支	4℃干燥 避光保存	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 2 支	-20℃保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、天平、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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 打开酶标仪, 设置温度 37℃ (若仪器无法控温, 则等待仪器过自检程序即可), 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 200U/mL=10μg/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 50 μ L，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：

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

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

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 10 μ g/mL； V1---标准品加样体积，20 μ L=0.02mL；

V2---样本加样体积，20 μ L=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。