

溶菌酶 (LZM) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A050-1-1 比浊法 30T/28 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

本所比浊法测定溶菌酶活性方法主要有三种: (注意本实验是测透光度值而非吸光值)

- 1、自身对照法 (附录 I): 适用于所有样本;
- 2、空白对照法 (附录 II): 适用于无色澄清透明的样本;
- 3、标准曲线法 (附录 III): 适用范围同空白对照法。

一、测定原理:

在一定浓度的混浊菌液中, 由于溶菌酶能水解细菌细胞壁上肽聚糖使细菌裂解而浓度降低, 透光度增强, 故可以根据透光度变化来推测溶菌酶的含量。

二、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

1、试剂组成:

- 试剂一:** 菌粉, 5mg×4 支, 2~8℃干燥处保存。
试剂二: 菌粉溶剂, 100mL×1 瓶, 2~8℃保存, 并每月放微波炉中消毒 20 秒。
试剂三: 标准品, 粉剂 2mg×1 支(活力为 8 万单位/mg), 2~8℃干燥处保存。

[注]: 试剂盒严格按照上述方法保存有效期可延至一年。

2、试剂配制:

(1)、贮备菌液的配制:

取 5mg/支的菌粉 1 支, 加菌粉溶剂 1mL, 混匀后转移到匀浆管中, 轻轻缓慢上下旋转研磨 3 分钟(切勿溅出), 即为贮备菌液, 将其取出后置 2~8℃冰箱密封可保存一周左右。

(2)、应用菌液的配制:

按**贮备菌液:菌粉溶剂=1:19**进行配制, 需多少配多少, 用时摇匀。

(3)、标准品的配制:

①、标准品贮备液的配制:

每支准确加双蒸水 1.0mL 配成 2mg/mL 的标准品贮备液。2~8℃可保存 7~10 天。

②、标准品应用液的配制:

临用时按标准品贮备液: 双蒸水=1:99 比例先稀释成 20μg/mL 的标准品应用液, 再将 20μg/mL 标准液用双蒸水 8 倍(1:7)稀释, 得到 2.5μg/mL (即 200U/mL) 的标准品应用液, 需多少配多少。2~8℃可保存 7~10 天。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 530nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、37℃水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、玻璃匀浆器(研磨菌粉用, 本公司有售)、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(组织样本用, 本公司有售)。

附录 I: 自身对照法测定溶菌酶

[注]: 本法用分光光度计测得值必须是透光度值。

1、操作步骤

- ①、将配制好的应用菌液放入 37℃水浴箱中预温 10 分钟以上, 使菌液温度达到 37℃。标准液与样本同温。
- ②、将可见分光光度计于 530nm 处, 1cm 光径比色皿, 以双蒸水调透光度 100% (比色皿准备两只, 一只用于调透光度 100%, 另一只用于测定)。
- ③、往相应编号的试管中加入 0.2mL 待测样本, 取 2mL 应用菌液迅速冲入试管中, 立即混匀并计时。(标准品应用液取 0.2mL 加入 2mL 应用菌液, 其它操作与测定相

同)

④、迅速倒入比色皿中在可见分光光度计 530nm 处, 15 秒时读取透光度值 T_0 , 比色皿不要取出, 在 2 分 15 秒时读取透光度值 T_2 ;

⑤、求出 2 次透光度的差值 ($\Delta T = T_2 - T_0$)。

[注 1]: 应用菌液使用时每隔一段时间最好混匀一下。

[注 2]: 当测定管 ΔT 大于 10 时, 请将样本稀释后再测。

[注 3]: 用同一比色皿每检测一个样本后均要用双蒸水冲洗干净, 才可再放第二个样本或标准品应用液。

2、计算公式:

$$\text{液体样本溶菌酶含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{\Delta T_{\text{测定}}}{\Delta T_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

$$\text{组织溶菌酶含量} (\mu\text{g/mgprot}) = \frac{\Delta T_{\text{测定}}}{\Delta T_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准液浓度, 2.5μg/mL 即 200U/mL 即 1μg = 80U。

N : 样本测试前稀释倍数。

C_{pr} : 匀浆液蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

附录 II: 空白对照法测定溶菌酶

(适用于无色澄清透明的样本, 如部分血清、尿液唾液等)

[注]: 本法用分光光度计测得值必须是透光度值。

1、操作表: (操作最好在冰水浴中进行):

[注]: 冰水浴即自来水中加几块冰。

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.2		
2.5μg/mL 标准应用液 (mL)		0.2	
样本 (mL)			0.2
应用菌液 (mL)	2.0	2.0	2.0

混匀, 37℃准确水浴 15 分钟, 立即取出置于 0℃以下的冰水浴中 3 分钟, 逐管取出倒入 1cm 光径比色皿中, 530nm 处以双蒸水调透光度 100%, 比色, 测各管透光度 T_{15} (T_{15} 即 37℃水浴 15 分钟后的透光度值)。

[注 1]: 读数时可能在比色皿表面有水雾形成, 请将比色皿擦干净后再读。

[注 2]: 测试过程中为消除每只测定管之相互间的干扰, 所以必须在每支管子测定前将比色皿用双蒸水冲洗干净。

[注 3]: OT_{15} 为水浴 15 分钟后的空白管透光度, UT_{15} 为水浴 15 分钟后测定管的透光度, ST_{15} 为水浴 15 分钟后标准管的透光度。

[注 4]: 测定管 T_{15} -空白管 T_{15} 大于 15 时, 请将样本稀释后再测。

2、计算公式:

$$\text{溶菌酶含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{T_{\text{测定}} - T_{\text{空白}}}{T_{\text{标准}} - T_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

$C_{\text{标准}}$: 标准液浓度, 2.5μg/mL 即 200U/mL 即 1μg = 80U。

N : 样本测试前稀释倍数。

注意事项

- 1、菌粉尽量研磨细质均匀，研磨时防止菌液溅出。
- 2、菌液、标准品、样本必须先于 0℃ 冰水浴中预冷 5 分钟以上。**37℃ 水浴前的操作最好在冰水浴中进行。**
- 3、为了避免检测误差，空白管单独用一个比色皿比色，每次加样前或比色之前比色杯要先用自来水冲洗干净，再用双蒸水冲洗 2~3 遍。
- 4、比色时各管从冰水中逐个取出比色。比色皿过冷会在皿壁上形成水雾，所以要擦干再比色。
- 5、试管要用同一批次。
- 6、为了减少误差 1cm 光径的比色皿也要进行校正。
- 7、比色与计时要同步，准确控制时间。最好为二个人或者用自动生化分析仪。
- 8、自身对照法测定时，假如样本 ΔT 值较小（小于 0.5），则可将反应时间延长（如 5 分钟或 10 分钟），但延长时检测时标准液需稀释一定的倍数（与时间延长的倍数一致）才行。

附录 III：标准曲线法测定溶菌酶

1、标准曲线的制备：

①、标准液的稀释：

将标准品一支准确加双蒸水 1.0 mL，混匀，配成 160000 U/mL 的标准品贮备液，再用双蒸水分别稀释成 2000 U/mL、1000 U/mL、500 U/mL、250 U/mL、125 U/mL、62.5 U/mL、31.25 U/mL、15.625 U/mL 的不同浓度的标准液。

②、将各种浓度的溶菌酶标准液置于样本所在的温度条件下 5 分钟以上，应用菌液在 37℃ 预温 10 分钟以上。

③、按下表进行操作：（操作最好在冰水浴中进行）

	空白管	标准管
双蒸水 (mL)	0.2	
不同浓度标准液 (mL)		0.2
应用菌液 (mL)	2.0	2.0

37℃ 准确水浴 15 分钟，立即取出置于 0℃ 以下的冰水浴中 3 分钟，逐管取出，倒入 1cm 光径比色皿中，530nm 处，双蒸水调透光度 100%，比色，测各管透光度 T_{15} (T_{15} 即 37℃ 水浴 15 分钟后的透光度值)。

④、作坐标图：

以各标准管的单位浓度为横坐标，以各管透光度差值为纵坐标作图。

- 2、样本按附录 II 操作表进行测定然后查标准曲线（但不如计算公式方便）[注]：因试剂盒内带有标准品，每次只需做 1~2 只标准管即可以，一般不需要作标准曲线。

