

溶菌酶(LZM)活性检测试剂盒96样说明书

规格：微量法 100管/96样

编号：JLC_K14825

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

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。

测定原理

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。

自备仪器和用品

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。

试剂清单

试剂名称	规格	数目	贮藏
试剂一	液体30mL	x1	4℃
试剂二	粉剂mg	x1	4℃,密封

样品提取 (按照步骤依次操作)

一、组织样本

- 1、取约0.1g组织，加入1mL生理盐水，进行冰浴匀浆；
- 2、然后离心10min (12,000rpm 4℃)，取上清，置冰上待测。

若增加样本量，可按照组织质量 (g)：生理盐水体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

二、细胞样本

1、按照细胞数量 (10^4 个) : 生理盐水体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细胞加入1mL生理盐水) , 冰浴超声波破碎细胞 (功率300w, 超声3秒, 间隔7秒, 总时间3min) ; 然后10000g, 4°C, 离心10min, 取上清置于冰上待测。

三、液体样本

1、澄清的液体直接检测, 若浑浊则离心后取上清液检测。

实验准备

- 1、酶标仪预热30min以上, 设定温度25°C, 设定波长到450nm。
- 2、试剂二的制备: 加入5mL试剂一涡旋振荡, 至全部溶解备用。
- 3、所有试剂孵育至室温。

测定步骤

1、在96孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管
样本	30
试剂二	180
混匀, 1min于450nm读取吸光值A1, 4min时再读取 A2 Δ A=A1-A2	

注意

- 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A1的值小于1或 Δ A的值大于0.5, 可对样本稀释后再测定。计算结果除以稀释倍数。
- 3、若测定管的 Δ A小于0.005, 可增加反应时间(如增至10min, 则改变后的T代入计算公式重新计算。

结果计算

(1)按照体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位。

溶菌酶活性(U/mL)= $\Delta A \div V1 \div 0.001 \div T=11111.1 \times \Delta A$

(2)按样本质量计算:

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位

。

溶菌酶活性(U/g)= $\Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.001 \div T = 11111.1 \times \Delta A \div W$

(3)按样本蛋白浓度计算:

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 450nm 吸光值变化 0.001 为一个酶活单位。

溶菌酶活性(U/mg prot)= $\Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.001 \div T = 11111.1 \times \Delta A \div Cpr$

(4)按照细胞数量计算:

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位。

溶菌酶活性(U/ 10^4 cell)= $\Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.001 \div T = 22.2 \times \Delta A \div W$

V1: 样本加样体积, 30 μ L=0.03mL;

W: 取样质量, g;

V: 提取加入的生理盐水体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

T: 反应时间, 3min

500: 500万, 细胞数量

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。