

溶菌酶(LZM)活性检测试剂盒F48样说明书

规格：分光光度法 50管/48样

编号：JLC_K14829

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50mL | x1 | 4℃ |
| 试剂二 | 粉剂mg | X2 | 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20mL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EP管中依次操作

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
| 样本 | 150 |
| 试剂二 | 700 |

混匀后转移到比色皿中, 1min后于450nm读取吸光值A1, 4min时再读取A2 $\Delta A = A1 - A2$

注意

- 1、加完试剂二反应即开始,若是样本量过多, 建议分批检测, 避免加样时间造成测定误。
- 2、若A1的值小于1.4或 ΔA 大于0.8, 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 ΔA 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 0.0005 为一个酶活单位。

$$\text{溶菌酶活性(U/mL)} = \Delta A \div V1 \div 0.0005 \div T = 4444.4 \times \Delta A$$

(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0.0005为一个酶活单位。

$$\text{溶菌酶活性(U/g)} = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.0005 \div T = 4444.4 \times \Delta A \div W$$

(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 0.0005 为一个酶活单位。

$$\text{溶菌酶活性(U/mg prot)} = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.0005 \div T = 4444.4 \times \Delta A \div Cpr$$

(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 0.0005 为一个酶活单位。

$$\text{溶菌酶活性(U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.0005 \div T = 8.9 \times \Delta A \div W$$

V1: 样本加样体积, 150 μ L=0.15mL; 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

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。