

溶菌酶 (LZM) 测定试剂盒

(货号: BC091 比浊法 30 管/28 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预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): 适用于无色澄清透明的样本。

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、所需仪器及试剂:

可调 530nm 波长的可见分光光度计及 1cm 光径比色皿,涡旋混匀器,37°C 水浴锅,秒表,试管或离心管,生理盐水,蒸馏水,匀浆管 (或玻璃研磨器)。

三、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°C 干燥处保存。

试剂二: 菌粉溶剂, 100mL×1 瓶, 2~8°C 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°C 干燥处保存。

[注]: 试剂未拆封且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 分钟左右 (切勿溅出),即为贮备菌液,将其取出后置 2~8°C 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°C 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°C 可保存 7~10 天。

四、样本前处理:

血清 (浆) 等液体样本: 直接测定或稀释一定倍数后测定,若浑浊,可 4000-8000rpm/min 离心 10 分钟取上清测定;

组织样本: 取组织,称重,按重量体积比 1g: 9mL 的比例加入生理盐水,冰水浴匀浆,4000rpm/min 离心 10 分钟,取上清待测。(组织匀浆上清需测其蛋白浓度,蛋白测定试剂本公司有售)

五、预实验要求:

若是样本活性过高,可控制 $\Delta T_{\text{测定}}$ 在2~5之间;若是样本活力较低,则尽量使 $\Delta T_{\text{测定}} > 0.5$,为此可加大样本量测定或是延长第二次读数时的时间。

六、样本测定(自身对照法):

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待测样本或2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准液,取2mL应用菌液迅速冲入试管中,立即混匀并计时。
- 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 ,将比色皿中的溶液倒回原试管中,将试管放入37℃水浴锅水浴,并在2分5秒时取出,再次倒入比色皿,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摇匀一下。

[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:

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

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

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

N :样本测试前稀释倍数。

Cpr :匀浆液蛋白浓度,mgprot/mL(prot指蛋白);

3、计算举例:

例1:取唾液用生理盐水1:1稀释后,取0.2mL按上述操作进行检测,测得测定管透光度 T_0 值为19.1,测定管透光度 T_2 值为21.3,标准管透光度 T_0 值为30.0,标准管透光度 T_2 值为33.5,标准管浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量} \left(\mu\text{g}/\text{mL} \right) &= \frac{21.3 - 19.1}{33.5 - 30.0} \times 2.5 \times 2 \\ &= 3.14 \mu\text{g}/\text{mL} \\ &= 251.43 \text{U}/\text{mL} \end{aligned}$$

例2:取罗非鱼血清原液0.2mL按上述操作进行检测,测得测定管透光度 T_0 值为11.9,测定管透光度 T_2 值为16.3,标准管透光度 T_0 值为26.4,标准管透光度 T_2 值为29.5,标准管浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量} \left(\mu\text{g}/\text{mL} \right) &= \frac{16.3 - 11.9}{29.5 - 26.4} \times 2.5 \\ &= 3.548 \mu\text{g}/\text{mL} \\ &= 283.87 \text{U}/\text{mL} \end{aligned}$$

例3:鱼肝脏匀浆的溶菌酶测定

①、样本前处理:

取鱼肝脏称重,按肝重量:生理盐水体积=1:19制成5%组织匀浆(此匀浆比例并非唯一,可由预实验得到合适样本浓度($\Delta T_{\text{测定}}$ 在2~5内时对应的样本浓度))。然后将

制得的匀浆 8000 ~ 10000 rpm/min, 离心 10 ~ 15 分钟, 离心后透光度上层脂肪较多, 可用棉签将脂去掉, 吸取中间较澄清液体 (仍有浑浊) 进行检测。

②、自身对照法检测结果:

测定管透光度 T_0 值为 21.7, 测定管透光度 T_2 值为 24.5, 标准管透光度 T_0 值为 26.7, 标准管透光度 T_2 值为 29.6, 标准管浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5% 匀浆蛋白含量为 4.203mgprot/mL, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量} &= \frac{24.5 - 21.7}{29.6 - 26.7} \times 2.5 \div 4.203 \\ (\mu\text{g}/\text{mgprot}) &= 0.574 \mu\text{g}/\text{mgprot} \\ &= 45.92\text{U}/\text{mgprot} \end{aligned}$$

4、注意事项:

- (1)、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), 但延长时间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。
- (2)、若样本较浑浊且活性较低, 测定时可能 $\Delta T_{\text{测定}}$ 过小甚至为负值, 此时则最好将样本高速 (10000~15000rpm/min) 离心使其澄清后再用。
- (3)、比色与计时要同步, 准确控制时间。最好为二人配合操作。
- (4)、每隔一段时间最好将仪器用蒸馏水重新调透光率 100%。

附录 I：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°C准确水浴 15 分钟，立即取出置于 0°C 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%，比浊，测各管透光度 T。			

[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]： $T_{\text{测定}} - T_{\text{空白}}$ 大于 15 时，请将样本稀释后再测。

2、计算公式：

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

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

N ：样本测试前稀释倍数。

3、计算举例：

取唾液用生理盐水 1:1 稀释后，取 0.2mL 按上表进行检测，测得空白管透光度 T_{15} 值为 29.8，测定管透光度 T_{15} 值为 44.7，标准管透光度 T_{15} 值为 58.1，标准管浓度为 2.5µg/mL，则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{溶菌酶含量} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) &= \frac{44.7 - 29.8}{58.1 - 29.8} \times 2.5 \times 2 \\ &= 2.63 \mu\text{g/mL} \\ &= 210.6 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

4、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 0°C 冰水浴中预冷 5 分钟以上。**37°C 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。

附录 II：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 1mL，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°C 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°C 准确水浴 15 分钟，立即取出置于 0°C 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%，比浊，测各管透光度 T。

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）

3、[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。

