溶菌酶（LYS/LZM）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-DB007　微板法 96 样）

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	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（10^4）：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 530m。。

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℃条件下反应，30s 于 530nm 读取吸光值 A1，10min30s 时再读取 A2，△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△A 小于 0.005，可增加样本上清液体积 V2(如增至 50μL，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：

溶菌酶含量(μg/g)=(C 标准×V1)×△A 测定管÷△A 标准管×D÷(W×V2÷V)

=10×△A 测定管÷△A 标准管÷W×D

溶菌酶含量(U/g)=(C 标准×V1)×△A 测定管÷△A 标准管×D÷(W×V2÷V)

=200×△A 测定管÷△A 标准管÷W×D

2、按样本蛋白浓度计算：

溶菌酶含量(μg/mg prot)=(C 标准×V1)×△A 测定管÷△A 标准管×D÷(Cpr×V2÷V)

=10×△A 测定管÷△A 标准管÷Cpr×D

溶菌酶含量(U/mg prot)=(C 标准×V1)×△A 测定管÷△A 标准管×D÷(Cpr×V2÷V)

=200×△A 测定管÷△A 标准管÷Cpr×D

3、按照体积计算：

溶菌酶含量(μg/mL)=C 标准×△A 测定管÷△A 标准管×D=10×△A 测定管÷△A 标准管×D

溶菌酶含量(U/mL)=C 标准×△A 测定管÷△A 标准管×D=200×△A 测定管÷△A 标准管×D

4、按细菌/细胞数量计算：

溶菌酶含量(μg/10^4 cell)=(C 标准×V1)×△A 测定管÷△A 标准管×D÷(500×V2÷V)

=10×△A 测定管÷△A 标准管÷500×D

溶菌酶含量(U/10^4 cell)=(C 标准×V1)×△A 测定管÷△A 标准管×D÷(500×V2÷V)

=200×△A 测定管÷△A 标准管÷500×D

C 标准---标品浓度，200U/mL，即 10μg/mL；　　V1---标准品加样体积，20μL=0.02mL；

V2---样本加样体积，20μL=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。