

溶菌酶 (Lysozyme)

<微量法 100 管/96 样>

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°C	
试剂二	粉剂 mg	x1	4°C,密封	
标准品粉剂	粉剂 mg	x1	-20°C	20KU 溶菌酶粉剂

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）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

二、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 37℃，设定波长到 530nm。
- 2、试剂二的制备：加入 22mL 试剂一涡旋振荡，至全部溶解备用。
- 3、标准品的制备：在 标准品粉剂 中加入 1mL 蒸馏水充分溶解，再用蒸馏水稀释 100 倍（即 1：99），终浓度为 200U/mL，即 5ug/mL。
- 4、所有试剂在 37℃条件下孵育 5min。

测定操作：

- 1、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (只做一管)
样本	20	-
标准品	-	20
试剂二	200	200
混匀，30s 于 530nm 读取吸光值 A1，2min30s 时再读取 A2 $\Delta A = A1 - A2$		

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 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 ΔA 小于 0.005，可增加样本上清液体积 V2(如增至 50μL，则标准管多加 30μL 蒸馏水，保证两管总体积一致)，则改变后的 V2 代入计算公式重新计算。

结果计算：

(1) 按照体积计算：

$$\begin{aligned}\text{溶菌酶含量}(\mu\text{g/mL}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \\ &= 5 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned}\text{溶菌酶含量}(\mu\text{g/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (W \times V_2 \div V) \\ &= 5 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div W \times D\end{aligned}$$

(3) 按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned}\text{溶菌酶含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times D \div (C_{\text{pr}} \times V_2 \div V) \\ &= 5 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}} \times D\end{aligned}$$

C 标准：标品浓度，200U/mL，即 5μg/mL；

V：提取液，1mL；

V1：标准品加样体积，20μL=0.02mL；

W：取样质量，g；

V2：样本加样体积，20μL=0.02mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

D：稀释倍数，未稀释即为 1；

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。