

溶菌酶 (Lysozyme) 活性(国标法)

< 编号: ml300822 分光光度法 50 管/48 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 50mL	x1	4°C	
试剂二	粉剂 mg	x2	4°C,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°C), 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。

测定操作:

- 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差。
- 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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

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。