

溶菌酶（LZM）测试盒/带标准

比浊法 30 管/28 样

本所比浊法测定溶菌酶活性主要有三种：

- 1、自身对照法：适用于样本数量较少，或者样本有混浊或有颜色（如血液红色）；
- 2、空白对照法：适用于样本量多且样本比较澄清；
- 3、标准曲线法。

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、试剂组成及配制

1、试剂组成：

试剂一：菌粉，5mg×4 支，2~8℃干燥保存，有效期 6 个月。

试剂二：菌粉溶剂，100ml×1 瓶，2~8℃保存，并每月放微波炉中温消毒 20 秒，有效期 6 个月。

试剂三：标准品，粉剂 2mg×1 支（活力为 8 万单位/mg），2~8℃干燥保存，有效期 6 个月。

[注]：试剂盒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，倒入匀浆管中，加菌粉溶剂 1ml，轻轻缓慢上下旋转研磨 3 分钟（切勿溅出），即为贮备菌液，将其取出后置 2~8℃冰箱密封保存一周左右。

（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。剩下的应用菌液 2~8℃可保存一周左右。最好是现用现配，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℃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=1：799 比例稀释成 2.5μg/ml（即 200U/ml）的标准品应用液，需多少配多少。2~8℃保存，可保存 7~10 天。

[注]：本法用分光光度计 530nm 处,1cm 光径比色皿测得是样本或标准的透光度值

1、操作步骤

①、将配制好的应用菌液，标准应用液及所需检测的样本均放入 37℃水浴箱中预温 5 分钟以上。使菌液，标准液及检测样本的温度达到 37℃。

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%,一只用于测定)。

③、往相应编号的试管中加入 0.2ml 待测样本，取 2ml 应用菌液迅速冲入试管中，立即混匀并计时。(标准品应用液取 0.2ml,加入 2ml 应用菌液,其它操作与测定相同)

④、迅速倒入比色皿中在可见分光光度计 530nm 处比色，5 秒时读取透光度值 T₀，比色皿不要取出，在 2 分 5 秒时读取透光度值 T₂；

[注]：如 5 秒时来不及读数，可 20 秒时读取调透光度值 T₀，在 2 分 20 秒时读取透光度值 T₂，标准管需同

样操作。

⑤、求出 2 次透光度的差值 (ΔT= T₂-T₀)。

[注]：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：

$$\text{溶菌酶含量} (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{\text{测定透光度 } UT_2^{[注_2]} - \text{测定透光度 } UT_0^{[注_1]}}{\text{标准透光度 } ST^{[注_4]} - \text{标准透光度 } ST^{[注_3]}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(2.5\mu\text{g} / \text{ml} \text{ 即 } 200U / \text{ml})} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

[注]：本法用分光光度计 530nm 处,1cm 光径比色皿测得是样本或标准的透光度值 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 溶菌酶标准应用液 (ml)		0.2	
样本 (血清、尿、稀释的唾液等) (ml)			0.2
应用菌液 (ml)	2.0	2.0	2.0
混匀，37℃准确水浴 15 分钟，立即取出置于 0℃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%，比色，测各管透光度 T₁₅ (T₁₅ 即 37℃水浴 15 分钟后的透光度值)。

[注 1]：比色时可能在比色皿表面有水雾形成，请将比色皿擦干净后再比色。

[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]：OT₁₅ 为水浴 15 分钟后的空白管透光度，UT₁₅ 为水浴 15 分钟后测定管的透光度，ST₁₅ 为水浴 15 分钟后标准管的透光度。

2、计算公式：

$$\text{溶菌酶含量} (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{测定透光度 } UT_{15} - \text{空白透光度 } OT_{15}}{\text{标准透光度 } ST_{15} - \text{空白透光度 } OT_{15}} \times \text{标准品浓度} (2.5\mu\text{g/ml 即 } 200\text{U/ml}) \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

1、标准曲线的制备:

①、标准液的配制:

将标准品 2mg 准确加双蒸水 1.0 ml, 混匀, 配成 160000 U/ml 的标准品贮备液, 再取适量的标准品贮备液, 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、将应用菌液及各种浓度的溶菌酶标准液置于 0℃的冰水中预冷 5 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	测定管
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℃准确水浴 15 分钟, 立即取出置于 0℃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%, 比色, 测各管透光度 T15 (T15 即 37℃水浴 15 分钟后的透光度值)。

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、按方法二进行测定然后查标准曲线 (但不如计算公式方便)

[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。

溶菌酶标准曲线

