

乳糖 (Lactose) 和半乳糖 (D-Galactose) 含量试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

乳糖在 β -半乳糖苷酶作用下分解成半乳糖和葡萄糖, 半乳糖接着在含有半乳糖脱氢酶的复合酶作用下被分解, 同时使 NAD^+ 还原成 NADH , 通过检测 340nm 下 NADH 的增加量, 分别计算得到乳糖和半乳糖的含量。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 $\mu\text{L}\times 1$ 支	4°C 保存	临用前甩几下或离心, 使微量液体落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水混匀
试剂二	液体 5mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉体 mg $\times 1$ 支	4°C 保存	临用前甩几下或离心, 使粉体落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用
试剂四	液体 12mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
试剂五	液体 $\mu\text{L}\times 1$ 支	-20°C 保存	临用前甩几下或离心, 使微量液体落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水混匀
标准品	乳糖标品 (1mg/mL)	4°C 保存	仅用来鉴定试剂是否正常。
	半乳糖标品 (0.5mg/mL)		

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、乳糖 (Lactose) 和半乳糖 (D-Galactose) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① **组织样本:** 0.1g 组织样本 (水分充足的样本建议取 0.2g 左右), 加 1mL 的蒸馏水研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。
- ② **液体样品:** 近似中性的澄清液体样本可直接检测; 若为酸性样本则需先用 $\text{NaOH}(2\text{M})$ 调 PH 值约 7.4, 然后室温静置 30min, 取澄清液体直接检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min, 为了减少操作误差, 建议使用排枪。
- ③ 做实验前可以选取几个样本做预测定, 若待检测指标含量较高可通过用蒸馏水稀释找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。
- ④ 依次在 96 孔板中加入:

试剂名称 (μL)	乳糖		半乳糖	
	测定管	空白管 (仅做一次)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	10		10	
蒸馏水	20	30	30	40
试剂一	10	10		
试剂二	30	30	30	30

混匀，25°C条件下孵育20min				
试剂三	10	10	10	10
试剂四	110	110	110	110
混匀，25°C条件下孵育5min于340nm处读取各管的A1值				
试剂五	10	10	10	10
混匀，25°C条件下反应20min于340nm处读取各管的A2值（若A值继续增加，需延长反应时间，直至2分钟内的吸光值保持不变）				

- 【注】1. 若 A2 值大于 1 则需用蒸馏水对样本进行稀释，或者降低样本加样体积 V1（如减至 5μL，则蒸馏水相应增加），则稀释倍数 D 或 V1 需代入公式重新计算。
2. 若 A2-A1 的差值小于 0.1 则可增加样本取样质量 W 或增加样本加样体积 V1（如增加至 20μL，则蒸馏水相应减少），则改变后的 W 或 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

$$\Delta A_{\text{乳糖+半乳糖}} = (A2 - A1)_{\text{乳糖测定管}} - (A2 - A1)_{\text{乳糖空白管}}$$

$$\Delta A_{\text{半乳糖}} = (A2 - A1)_{\text{半乳糖测定管}} - (A2 - A1)_{\text{半乳糖空白管}}$$

$$\Delta A_{\text{乳糖}} = \Delta A_{\text{乳糖+半乳糖}} - \Delta A_{\text{半乳糖}}$$

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A_{\text{乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 342.3 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 2.2 \times \Delta A_{\text{乳糖}} \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{半乳糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A_{\text{乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 342.3 \div V1 \times D \\ &= 2.2 \times \Delta A_{\text{乳糖}} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{半乳糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div V1 \times D \\ &= 1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \times D \end{aligned}$$

ε---NADH的摩尔吸光系数为6.22×10³L/mol/cm；

d---光径距离，0.5cm；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本体积，10μL=0.01mL；

V2---反应总体积，200μL=2×10⁻⁴L；

乳糖分子量---342.3；

半乳糖分子量---180.16；

W---样本质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为1。