

## 半乳糖（D-Galactose）含量试剂盒说明书

（微板法 48 样）

### 一、产品简介：

半乳糖在含有半乳糖脱氢酶的复合酶作用下被分解，同时使 NAD<sup>+</sup>还原成 NADH，NADH 与特异显色剂反应生成于 450nm 处有特征吸收峰的黄色物质，通过检测该物质的增加量，计算得到半乳糖的含量。

### 二、测试盒组成和配制：

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求 | 备注                                     |
|------|--------------|------|--|
| 试剂一  | 粉体 mg×1 支    | 4℃保存 | 临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，再加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。   |
| 试剂二  | 液体 0.5mL×1 支 | 4℃保存 |  |
| 试剂三  | 液体 8mL×1 瓶   | 4℃保存 |  |
| 试剂四  | 液体 μL×1 支    | 4℃保存 | 临用前甩几下或离心，使微量液体落入底部，再加 0.55mL 蒸馏水混匀备用。 |
| 标准品  | 液体 mL×1 支    | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。                         |

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、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 **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 NaOH(2M)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 450nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），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）   | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|--|-----|-----------|
| 样本   | 10  |           |
| 蒸馏水  | 30  | 40        |
| 试剂一  | 10  | 10        |
| 试剂二  | 10  | 10        |
| 试剂三  | 130 | 130       |
| 混匀，25℃条件下孵育5min于450nm处读取各管的A1值   |     |           |
| 试剂四  | 10  | 10        |
| 混匀，25℃条件下反应20min于450nm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）， $\Delta A_{\text{半乳糖}} = (A2-A1)_{\text{测定管}} - (A2-A1)_{\text{空白管}}$ 。 |     |           |

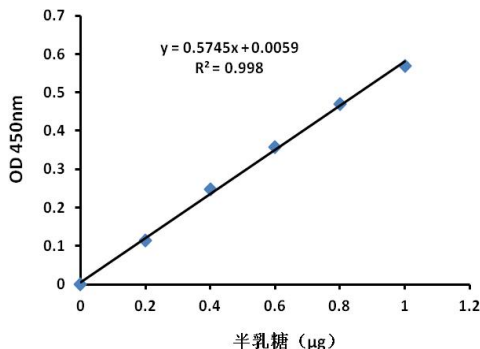
【注】1. 若 A2 值大于 1 则需用蒸馏水对样本进行稀释，或者降低样本加样体积 V1（如减至 5μL，

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 20 $\mu$ L，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：

- 1、标准曲线方程为  $y = 0.5745x + 0.0059$ ；x 为标准品质量（ $\mu$ g），y 为吸光值  $\Delta A$ 。



- 2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{半乳糖含量}(\mu\text{g/g鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0059) \div 0.5745] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 174.1 \times \Delta A \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按照体积计算：

$$\text{半乳糖含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A - 0.0059) \div 0.5745] \div V1 \times D = 174.1 \times \Delta A \times D$$

V---提取液体积，1mL；

V1---样本体积，10 $\mu$ L=0.01mL；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（0.5mg/mL）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 10 $\mu$ L 标准品+30 $\mu$ L 蒸馏水+10 $\mu$ L 试剂一+10 $\mu$ L 试剂二+130 $\mu$ L 试剂三+10 $\mu$ L 试剂四，混匀，20min 后于 450nm 处读值。根据结果即可制作标准曲线。