

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

(货号: ADS-W-TDX048 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水混匀; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使微量液体落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再加 1.1mL 蒸馏水混匀; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	乳糖标品 (0.5mg/mL)	4℃ 避光保存	1. 仅用来鉴定试剂是否正常; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
	半乳糖标品 (0.25mg/mL)		

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

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

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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、检测步骤:

- 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℃), 或可放在 25℃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:

试剂组分 (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℃条件下孵育20min				
试剂三	10	10	10	10
试剂四	110	110	110	110
混匀, 25℃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℃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:

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

$$=2.2 \times \Delta A_{\text{乳糖}} \times D$$

$$\text{半乳糖含量 (mg/mL)} = [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times 180.16 \div V_1 \times D$$

$$=1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \times D$$

ϵ ---NADH的摩尔吸光系数为 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d ---光径距离, 0.5cm;

V ---提取液体积, 1mL;

V_1 ---样本体积, $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$;

V_2 ---反应总体积, $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}\text{L}$;

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。