

乳糖 (Lactose) 含量检测试剂盒说明书

(分光法 24 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,葡萄糖被特异性酶氧化产生与显色剂反应的(粉)红色产物,该产物在 510nm 处有最大吸收峰,通过校正游离的葡萄糖背景值进而得到乳糖含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A1	液体 2mL×1 支	4℃保存	
提取液 A2	液体 2mL×1 支	4℃保存	
试剂一	液体 μ L×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 0.6mL 蒸馏水混匀。
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	临用前加 9mL 试剂三混匀备用。
试剂五	粉体 mg×1 支	-20℃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。
标准品	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 2mL 蒸馏水溶解即 5mg/mL 的葡萄糖,再用蒸馏水稀释成 0.3mg/mL 备用测定。

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、天平、移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、乳糖含量检测:

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 NaOH(2M)调 PH 值约 7.4,然后室温静置 30min,取澄清液体直接检测。可选取几个样本,进行不同倍数的稀释,选取适合本次样本的稀释倍数 D。
- ③ **高蛋白含量组织样本:** 称取约 0.1g 样本(水分充足的样本建议取 0.2g 左右),加 0.9mL 的蒸馏水研磨,粗提液全部转移到 EP 管中,加入 0.05mL 提取液 A1,混匀后加入 0.05mL 提取液 A2,混匀,用蒸馏水定容到 1mL,室温静置 30min,若有脂肪除去上层脂肪,12000rpm 室温离心 10min,取澄清的液体检测。
- ④ **细胞样本:** 先收集细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细胞加入 1mL 生理盐水或磷酸缓冲液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min,设置温度在 25℃,设定波长到 510nm,蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温(25℃)。

- 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 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	40	40		
标准品			40	
蒸馏水	80	100	100	140
试剂一	20			
试剂二	100	100	100	100
混匀，25℃条件下孵育20min				
试剂四	480	480	480	480
试剂五	20	20	20	20
混匀，37℃条件下避光孵育 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)，于 510nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。				

【注】1. 若对照管的 A 值超过 0.6，样本需用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若 ΔA 的值低于 0.01，可增加样本加样体积 V1 (如增至 80μL，则蒸馏水相应减少)，改变后的 V1 代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量}(\text{mg/g 鲜重}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.57 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量}(\text{mg/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div V1 \times D \\ &= 0.57 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量}(\text{mg}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div (\text{细胞数量} \\ &\quad \times V1 \div V) \times D = 0.57 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

乳糖分子量----342.3；

葡萄糖分子量----180.16；

C 标准---葡萄糖标准品的浓度，0.3mg/mL；

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入样本体积，0.04mL；

W----样本鲜重，g；

D----稀释倍数，未稀释即为 1。