

乳糖 (Lactose) 含量检测试剂盒说明书

(货号: BP10339W-96 微板法 96 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,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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液 A1	液体 1 瓶	4°C保存	
提取液 A2	液体 1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 1 支	4°C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. 加入 1.2mL 蒸馏水混匀; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 28mL×1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前加 14mL 试剂三混匀备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉体 2 支	-20°C避光保存	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。
标准品	粉体 1 支	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解即 5mg/mL 的葡萄糖; 3. 再稀释 10 倍成 0.5mg/mL 备用测定; 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

酶标仪、96 孔板、天平、移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、指标测定:

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。
- 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°C 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 510nm。
- 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 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	10	10		
标准品			10	
蒸馏水	20	30	30	40
试剂一	10			
试剂二	30	30	30	30
混匀，25℃条件下孵育20min				
试剂四	170	170	170	170
试剂五	10	10	10	10
混匀，37℃条件下避光孵育 30min，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 20μL，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：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量(mg/g 鲜重)} &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量(mg/mL)} &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div V1 \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div (\text{细胞数量} \\ &\quad \times V1 \div V) \times D = 0.95 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

4、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量(mg/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

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，0.5mg/mL；

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入样本体积，0.01mL；

W----样本鲜重，g；

细胞数量---万；

D----稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。