

牛乳中半乳糖（D-Galactose）含量试剂盒说明书

（货号：BP10342W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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⁺ 还原成 NADH，通过检测 340nm 下 NADH 的增加量，计算得到半乳糖的含量。

二、测试盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂 A1	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂 A2	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂 A3	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	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. 再加 0.55mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.55mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	半乳糖标品 (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。

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、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！

1.1、样本提取：

牛乳样品：此类样本浑浊，蛋白含量较高，需按照下述步骤进行除蛋白处理。

1.2、除样本中蛋白：

试剂组分	加入量 (μL)
试剂 A1	50
蒸馏水	100
样本	250
试剂 A2	50
试剂 A3	50

混匀，静置 5min 后于 12000rpm 离心 5min，上清液待检。

【注】1.此时样本相当于稀释 2 倍，即稀释倍数 D1 为 2。

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 D2。
- ④ 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分 (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	140	140
混匀，25℃条件下孵育5min于340nm处读取各管的A1值		
试剂三	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）， $\Delta A_{\text{半乳糖}} = (A2 - A1)_{\text{测定管}} - (A2 - A1)_{\text{空白管}}$		

【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 D2 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：

1、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{半乳糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div V1 \times D1 \times D2 \\ &= 1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \times D1 \times D2 \end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{半乳糖含量(mg/mg prot)} &= [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div V1 \times D1 \times D2 \div \text{Cpr} \\ &= 1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \times D1 \times D2 \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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；

V1---样本体积，10μL=0.01mL；

V2---反应总体积，200μL=2×10⁻⁴L；

半乳糖分子量---180.16；

D1---稀释倍数, 2;

D2---稀释倍数, 未稀释即为1。