

牛乳中乳糖（Lactose）含量检测试剂盒说明书

（货号:BP10343W 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，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
试剂 A1	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂 A2	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	
试剂 A3	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	
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	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 14mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 临用前加 7mL 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 1 支	-20℃ 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℃ 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：

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（ μ L）
试剂 A1	50
蒸馏水	350
样本	50

试剂 A2	25
试剂 A3	25
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 10 倍，即稀释倍数 D1 为 10；若需减少该步样本的稀释倍数
则可将样本增至 100，则蒸馏水减少至 300，则稀释倍数 D1 为 5。

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 D2。
- 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 D2 代入计算公式。
2.若 ΔA 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），
或减少除蛋白步骤中的稀释倍数 D1，改变后的 V1 和 D1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量}(\text{mg/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div V1 \times D1 \times D2 \\ &= 0.95 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D1 \times D2 \end{aligned}$$

2、按照样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{乳糖含量}(\text{mg/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 342.3 \div 180.16 \div V1 \times D1 \times D2 \div C_{\text{pr}} \\ &= 0.95 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D1 \times D2 \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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； V1---加入样本体积，0.01mL；

D1---稀释倍数，10。

D2---稀释倍数，未稀释即为 1。