乳糖（Lactose）含量

<编号：LT-F24-N(1620)　可见分光光度法 24 样>

注　　意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

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。

自备仪器和用品：

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。

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液 A1	粉剂 mg	x1	4℃	
提取液 A2	粉剂 mg	x1	4℃	
试剂一	粉剂 mg	x1	-20℃	
试剂二	粉剂 mg	x1	-20℃	
试剂三	液体 10mL	x1	4℃,避光	
试剂四	液体 18mL	x1	4℃	
试剂五	粉剂 mg	x1	-20℃,避光	
标准品	粉剂 mg	x1	4℃	10mg 葡萄糖标准粉剂

样品提取（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

1、0.1g 组织样本（水分充足的样本建议取 0.2g 左右），加 1mL 蒸馏水研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm 离，常温离心 10min，上清液待测。

二、液体样品

1、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)

三、高蛋白含量组织样本

1、提取液 A1 的制备：加入 2mL 蒸馏水充分溶解；

2、提取液 A2 的制备：加入 2mL 蒸馏水充分溶解；

3、称取约 0.1g 样本（水分充足的样本建议取 0.2g 左右），加 0.9mL 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。

四、细胞样本

1、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。

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

实验准备：

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、试剂一的制备：加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解；

3、试剂二的制备：加入 5mL 蒸馏水充分溶解；

4、试剂四的制备：加入 9mL 试剂三，混匀；

5、试剂五的制备：加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解；

6、标准品的制备：加入 2mL 蒸馏水充分溶解，即为 5mg/mL 葡萄糖溶液，再用蒸馏水稀释成 0.3mg/mL 备用测定；

微量粉剂开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖

7、所有试剂解冻至室温（25℃）；

测定操作：

1、在 EP 管中依次操作

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管（只做一次）	空白管（只做一次）
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 △A=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）				

注意：

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△A 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。

结果计算：

（1）按照质量计算：

乳糖含量(mg/g 鲜重)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)×342.3÷180.16÷(W×V1÷V)×D

=0.57×△A÷(A 标准-A 空白)÷W×D

（2）按照体积计算：

乳糖含量(mg/mL)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)×342.3÷180.16÷V1×D

=0.57×△A÷(A 标准-A 空白)×D

（3）按细胞数量计算：

乳糖含量(mg/10^4 cell)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)×342.3÷180.16÷(细胞数量×V1÷V)×D

=0.57×△A÷(A 标准-A 空白)÷细胞数量×D

乳糖分子量：342.3；

葡萄糖分子量：180.16；

C 标准：葡萄糖标准品浓度，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；

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。