

## 乳糖 (Lactose) 含量

<编号: LT-W48-N(1620) 微量法 100 管/48 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 $\beta$ -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。

### 所需仪器和用品:

酶标仪、96孔板、天平、移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

### 试剂盒组分与配制<sup>①</sup>:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A1	粉体 mg×1 支	4℃保存	加 3mL 的蒸馏水充分溶解备用。
提取液 A2	粉体 mg×1 支	4℃保存	加 3mL 的蒸馏水充分溶解备用。
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	加 0.6mL 蒸馏水混匀。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	加 3mL 的蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	临用前加 7mL 试剂三混匀备用
试剂五	粉体 mg×1 支	-20℃保存	加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	加 2mL 蒸馏水溶解即 5mg/mL 的葡萄糖,再稀释 10 倍成 0.5mg/mL 备用测定。

<sup>①</sup> 微量粉剂临用前甩几下或者离心,使粉剂落入底部后再开盖

## 乳糖含量检测:

### 一、样本制备:

- 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。
- 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。
- 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。

### 二、上机检测:

- 酶标仪预热 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 510nm。
- 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- 实验前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。
- 在 96 孔板中依次加入:

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	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°C条件下孵育20min				
试剂四	170	170	170	170
试剂五	10	10	10	10
混匀, 37°C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】:

- 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。
- 若  $\Delta A$  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。

## 结果计算:

### 1、按照质量计算:

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

### 2、按照体积计算:

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

乳糖分子量----342.3;

V1----加入样本体积, 0.01mL;

葡萄糖分子量----180.16;

W----样本鲜重, g;

V----加入提取液体积, 1mL;

D----稀释倍数, 未稀释即为 1。

C 标准---葡萄糖标准品的浓度, 0.5mg/mL;

### 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。