

乳糖酶活性检测试剂盒48样

规格：微量法 100管/48样

编号：JLC_K14841

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

测定意义

乳糖酶主要用于乳品工业，可使低甜度和低溶解度的乳糖转变为较甜的、溶解度较大的单糖；使冰淇淋、浓缩乳、淡炼乳中乳糖结晶析出的可能性降低，同时增加甜度。

测定原理

乳糖酶将样品中乳糖水解为葡萄糖；葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸，并产生过氧化氢；过氧化物酶催化过氧化氢氧化 4-氨基安替比林偶联酚，生成有色化合物，在 505nm 有特征吸收峰。

需自备的仪器和用品

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96孔板、研钵、冰、和蒸馏水。

试剂清单

试剂名称	规格	数目	贮藏	
试剂一	液体75mL	x1	4℃	
试剂二	液体3mL	x1	-20℃	
试剂三	液体10mL	x1	4℃,避光	
试剂四	液体10mL	x1	4℃,避光	
试剂五	液体10mL	x1	4℃, 密封	
标准品	粉剂	x1	4℃	10mg葡萄糖标准粉剂

样本处理(按照步骤依次操作)

一、组织样本

- 1、按照样本质量 (g) : 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL试剂一), 研磨成匀浆;
- 2、8000×g离心力 4°C 离心10min, 取上清液待测 (记为样本待测液)。
- 3、留取部分上清用于蛋白浓度测定。

实验准备

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 505nm
- 2、显色剂的配制: 临用前根据使用量将试剂三和试剂四1:1等体积混合, 现用现配;

测定操作:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本待测液	20	20
试剂二	20	-
终止液		20
蒸馏水	-	-
充分混匀, 37°C反应20min		
试剂五	20	
试剂二		20
混匀后取10μL加入显色剂		
显色剂	190	190
混匀, 37°C反应25min, 于505nm测定吸光值ΔA样=A测定-A对照		

注意: 如果ΔA样 > 1, 则需要将样本用试剂一进行稀释, 稀释倍数D代入计算公式;

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$. $y = 0.0565x + 0.00005$, $R^2 = 0.9999$

定义: 在37°C, pH=6.0条件下, 每毫克蛋白每分钟水解1nmol麦芽糖定义为一个酶活单位

。

麦芽糖酶活性 (U/mg prot) = $(\Delta A_{\text{样}} - 0.00005) \div 0.0565 \div 2 \div T \div C_{\text{pr}} \times 1000$;

2: 1个麦芽糖能分解成2个葡萄糖

T: 反应时间

Cpr: 样本加入反应体系中的蛋白浓度(mg/mL)

D: 稀释倍数, 未稀释即为1;

附：标准曲线的绘制（选做）

1、在标准管中加入1.11mL试剂一即为50mmol/L

2、将标准品稀释为30、20、10、5、2.5、1mmol/L;

(可根据自身实验需求调整标准品浓度)

试剂名称 (μL)	标准管	空白管
标准品	20	
试剂二	20	20-
试剂一	-	20
试剂五	20	20
混匀后取50μL加入显色剂		
显色剂	190	190
混匀, 37°C反应25min, 转移到比色皿中, 于505nm测定吸光值A $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

3、依据实验步骤操作, 根据结果绘制标准曲线 (x为标准管浓度mmol/L, y为吸光值 $\Delta A_{\text{标}}$);

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例

。