

牛乳中半乳糖（D-Galactose）含量试剂盒说明书

（货号：G05101W 微板法 48 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，再加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 μL×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心，使微量液体落入底部，再加 0.55mL 蒸馏水混匀备用。
标准品	半乳糖标品（0.5mg/mL）	4℃保存	仅用来鉴定试剂是否正常。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、半乳糖（D-Galactose）含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1.1、样本制备：

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：

试剂名称	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、上机检测：

- 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：

试剂名称 (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°C条件下孵育5min于340nm处读取各管的A1值		
试剂三	10	10
混匀, 25°C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:

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

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, $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$;

V2---反应总体积, $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}\text{L}$;

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。