

乳糖酶活性试剂盒 48 样

编号: ml300869

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

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。

自备仪器和用品:

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°C	
试剂二	液体 3mL	x1	-20°C	
试剂三	液体 10mL	x1	4°C,避光	
试剂四	液体 10mL	x1	4°C,避光	
试剂五	液体 10mL	x1	4°C, 密封	
标准品	粉剂	x1	4°C	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、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 A $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$		

注意:

如果 $A_{\text{测定}} > 1$, 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, 每毫克蛋白每分钟水解 1nmol 乳糖定义为一个酶活单位。

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

;

T: 反应时间

D: 稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr: 样本加入反应体系中的蛋白浓度(mg/mL)

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 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 A ΔA 标=A 标准-A 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ΔA 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最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。