

D-Galactose Content Kit

半乳糖含量试剂盒说明书

货号: BN72148 | 方法: 微板法 | 规格: 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、样本制备:

- ① **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。
- ② **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。

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 D。
- 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℃条件下孵育 5min 于 340nm 处读取各管的 A1 值		
试剂三	10	10
混匀, 25℃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)， $\Delta A_{\text{半乳糖}} = (A_2 - A_1)_{\text{测定管}} - (A_2 - A_1)_{\text{空白管}}$ 。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{半乳糖含量}(\text{mg/g鲜重}) &= [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\varepsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times 180.16 \div (V_1 \div V \times W) \\ &= 1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \div W \times D\end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned}\text{半乳糖含量}(\text{mg/mL}) &= [\Delta A_{\text{半乳糖}} \div (\varepsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times 180.16 \div V_1 \times D \\ &= 1.159 \times \Delta A_{\text{半乳糖}} \times D\end{aligned}$$

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；

V ---提取液体积，1mL；

V_1 ---样本体积， $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$ ；

V_2 ---反应总体积， $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

半乳糖分子量---180.16；

W ---样本质量，g；

D ---稀释倍数，未稀释即为1。