

## 乳果糖 (Lactulose) 含量检测试剂盒说明书

(货号: G0598W24 微板法 24 样)

### 一、产品简介:

乳果糖是一种包含 D-半乳糖和 D-果糖的双糖, 仅在高温下由普通牛奶中乳糖产生。在生牛奶中, 乳果糖的含量非常低。然而, 随着热处理的增加, 这种糖最终可以达到约 2g/L (例如, UHT 牛奶)。该试剂盒不适用“游离果糖”与乳果糖的比率极高的样本 (如人工加糖的样品 (如炼乳))。

本试剂盒采用特异性酶复合物分解乳果糖生成果糖和半乳糖, 果糖接着在PGI和己糖激酶等酶复合物作用下, 使NADPH的量不断增加, 通过检测340nm下该物质的增加量, 进而计算得到乳果糖含量。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 15mL×1 支	4°C保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C保存	
试剂三	液体 1mL×1 支	4°C保存	
试剂四	液体 2mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 μL×1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心, 使微量液体落入底部, 加 0.65mL 蒸馏水混匀备用 (可 -20°C分装冻存, 禁止反复冻融)。
试剂六	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂七	粉体 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心, 使粉体落入底部, 每支再加 1.2mL 蒸馏水混匀溶解, 静置 10min 后取上清液备用 (可 -20°C分装冻存, 禁止反复冻融)。
试剂八	粉体 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心, 使试剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水混匀溶解 (可 -20°C分装冻存)。
试剂九	粉体 mg×1 支	-20°C保存	
试剂十	粉体 mg×1 支	-20°C保存	
试剂十一	液体 μL×1 支	-20°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	该标准品为乳果糖和果糖的混标, 可作为质控品来检验试剂和反应是否正常。

### 三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、可调式移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

### 四、乳果糖含量检测:

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

#### 1.1、样本制备:

- ① 液体样品: 近似中性的澄清液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清液测定。
- ② 奶粉等固体样本: 取 0.1g 样本于 EP 管中, 加 1mL 的蒸馏水混匀溶解。

#### 1.2、除样本中蛋白:

	加入量 (μL)
试剂一	100
蒸馏水	350
样本	250

试剂二	25
试剂三	25
混匀，静置 5min 后于 12000rpm 离心 5min，上清液待检。	

**1.3、除样本中葡萄糖(试剂六和七和八可按照比例 80:20:10 混匀，用多少混多少，现配现用):**

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
1.2 步得到的上清液	50	50
试剂四	20	20
蒸馏水		20
试剂五	20	
混匀于 40°C 孵育 1 小时，结束后依次加入以下试剂且每加一次试剂后就立即混匀。		
试剂六	80	80
试剂七	20	20
试剂八	10	10
混匀，于 40°C 孵育 30min，再于 12000rpm 离心 5min，上清为待检。		

**1.4、上机检测:**

- ① 酶标仪预热 30min，设定波长到 340nm。
- ② 试剂预先解冻至 30°C 或 30°C 水浴锅孵育 10min，在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
1.3 步得到的上清液	50	50
试剂九	10	10
试剂一	120	120
混匀，30°C 孵育 5min 后于 340nm 处读取各管的 A1 值		
试剂十	10	10
混匀，30°C 反应 20min 于 340nm 处读取各管 A2 值 (若 A 值继续增加，需延长反应时间，直至 2 分钟内吸光值保持不变)		
试剂十一	10	10
混匀，30°C 反应 20min 于 340nm 处读取各管 A3 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)， $\Delta A = (A3 - A2)_{测定} - (A3 - A2)_{对照}$ 。		

**五、结果计算:**
**1、按照质量计算:**

$$\text{乳果糖含量(mg/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \times 12 \times D = 5.22 \times \Delta A \div W \times D$$

**2、按照体积计算:**

$$\text{乳果糖含量(mg/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div V1 \times 12 \times D = 5.22 \times \Delta A \times D$$

$\epsilon$ ---NADPH 的摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3$  L/mol/cm； V---加蒸馏水体积，1mL；  
 $d$ ---0.5cm； V1---1.4 步中样本体积，0.05mL； V2---1.4 步反应总体积， $2 \times 10^{-4}$  L；  
 $Mr$ ---乳果糖分子量，342.3； D---稀释倍数，未稀释即为 1； W---样本鲜重，g；  
 12---1.2 步骤中样本稀释 3 倍，1.3 步骤中上清液稀释 4 倍，两次共稀释 12 倍。