

# 二糖酶测试盒

(货号: BC119 测乳糖酶)

## 一、测定原理:

乳糖酶 (Lactase) 作用于相应的底物产生单糖, 该单糖在其氧化酶的作用下产生过氧化氢, 过氧化氢同显色剂结合产生红色的产物, 用分光光度计测定其光密度值, 从而测定出乳糖酶的活性。

## 二、试剂的组成和配制 (25T ~ 100T):

**试剂一:** 粉剂×1 瓶, 10mL 稀释液×1 瓶, 无色透明液体; 2~8℃保存。用时在试剂一粉剂中加入 10mL 的稀释液, 充分溶解后配成底物液, 备用; 2~8℃保存。

**试剂二:** 终止剂 5mL×1 瓶, 2~8℃保存。

**试剂三:** 50mL 液体×1 瓶, 2~8℃保存。

**葡萄糖标准液:** 5.55mmol/L, 液体, 2~8℃保存。用时按体积比 1:2 的比例加蒸馏水稀释成 1.85mmol/L 葡萄糖标准液。

## 三、操作表:

### 1、样本处理:

- ①、**液体样本:** 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。
- ②、**组织样本:** 准确称取组织重量,按重量(g): 体积(mL)=1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下机械匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟, 取上清液待测。  
[注]:匀浆介质可用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.4)或生理盐水 (0.9%);

### ③、细胞样本:

- A、**细胞收集:**将制备好的细胞悬液取出, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推荐 0.1mol/L 、pH7~7.4 磷酸盐缓冲液) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀;
- B、**细胞破碎:**加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3~5 秒/次, 间隔 30 秒, 重复 3~5 次)或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%,裂解 30~40 分钟),裂解好的液体不离心直接测定。[注]: 建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

### 2、酶促反应: (可用离心管操作)

	测定管	对照管
样本 (μL)	25	
底物 (μL)	50	50
混匀, 37℃孵育 20 分钟		
终止剂 (μL)	25	25
样本 (μL)		25
混匀, 4000 转/分钟离心 10 分钟, 取上清液显色		

### 3、显色反应: (第一种) (酶标仪比色) (100T)

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
蒸馏水 (μL)	8			
1.85mmol/L 葡萄糖标准液 (μL)		8		
上清液 (μL)			8	8
试剂三	200	200	200	200

轻轻震荡孔板, 37°C 孵育 15 分钟, 505nm 处, 酶标仪读数

**显色反应: (第二种) (分光光度计比色) (25T)**

	空白管	标准管	测定管	对照管
蒸馏水 (μL)	40			
1.85mmol/L 葡萄糖标准液 (μL)		40		
上清液 (μL)			40	40
试剂三	1000	1000	1000	1000
混匀, 37°C 孵育 15 分钟, 505nm 处, 蒸馏水调零, 分光光度计比色				

[注]: 在做正式实验前, 先要取个别样本 (可以挑选正常组一个和模型组一个) 进行浓度梯度预试 (稀释倍数可选 5 倍、10 倍、20 倍或其它), 以确定最佳取样浓度 (最佳浓度时, 测定 OD - 对照 OD 接近标准 OD 即可; 当然, 样本本身酶活力偏低时, 直接原液测定甚至可以加大酶促反应取样量或延长酶计算促反应时间)。

**四、公式:**

**1、液体样本计算:**

**单位定义:** 在 37°C PH6.0 的条件下, 每毫升样本每分钟水解 1nmol 乳糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{计算公式: 乳糖酶活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div T \times \frac{10^6}{V_{\text{样}}}$$

**C<sub>标准</sub>:** 标准品浓度, 1.85mmol/L;

**V<sub>反应</sub>:** 酶促反应总体积, 0.1×10<sup>-3</sup>L;

**V<sub>样</sub>:** 取样量, 0.025mL;

**T:** 酶促反应时间, 20 分钟;

**10<sup>6</sup>:** mmol→nmol 的转化。

**2、组织 (或细胞) 样本计算**

**单位定义:** 在 37°C PH6.0 的条件下, 每毫克蛋白组织每分钟水解 1nmol 乳糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{计算公式: 乳糖酶活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div T \times \frac{10^6}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}}$$

**C<sub>标准</sub>:** 标准品浓度, 1.85mmol/L;

**V<sub>反应</sub>:** 酶促反应总体积, 0.1×10<sup>-3</sup>L;

**V<sub>样</sub>:** 取样量, 0.025mL;

**T:** 酶促反应时间, 20 分钟;

**C<sub>pr</sub>:** 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

**10<sup>6</sup>:** mmol→nmol 的转化。

**五、计算举例:**

取新鲜制备的 10% 猪空肠黏膜匀浆, 按操作表进行操作, 酶标仪比色, 测得的空白孔 OD 是: 0.0695; 标准孔 OD 是 0.3025; 测定管 OD 是 0.1088; 对照孔 OD 是 0.0715; 10% 猪空肠黏膜匀浆的蛋白含量是 2.8632mg/mL, 计算如下:

$$\begin{aligned} \text{乳糖酶活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.1088 - 0.0715}{0.3025 - 0.0695} \times \frac{1.85 \times 0.1 \times 10^3}{20 \times 2.8632 \times 0.025} \\ &= 20.688 \text{ U/mgprot} \end{aligned}$$