

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F049

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长:530 nm, 发射波长:590 nm)

Elabscience®乳果糖荧光法测试盒

Lactulose Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测乳制品、粪便样本的乳果糖含量。

检测原理

乳果糖(4-o- β -galactopyranosyl-D-fructo-furanose, Lactulose)又名半乳糖苷果糖、4- β -D-半乳糖苷-D-果糖、乳酮糖,含有一份子半乳糖和一分子果糖。乳果糖是在牛乳热处理过程中,乳糖在酪蛋白游离氨基基团的催化作用下碱基异构化而形成的一种合成双糖。

乳果糖可在酶的作用下生成特定的产物,该产物与显色剂反应生成荧光产物检测激发波长为 530 nm,发射波长为 590 nm。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	沉淀剂 (Precipitator)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	澄清剂 (Clarificant)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抽提剂 (Extraction Agent)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	基质液 (Matrix Solution)	50 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	底物 (Substrate)	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	加速剂 (Accelerant)	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂十 (Reagent 10)	5 mmol/L 标准品溶液 (5 mmol/L Standard Solution)	1.6 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月

	96孔黑色酶标板	96孔×1块	无要求
	96孔覆膜	2张	
	样本位置标记表	1张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长：530 nm，发射波长：590 nm)、37°C 恒温箱、涡旋混匀仪

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂六工作液的配制：

取一支试剂六用2 mL试剂四溶解，得到的溶液全部转移至5 mL EP管中，加入2 μL试剂九，补加248 μL试剂四，混匀，未使用的溶液2-8°C避光可保存一周。

③ 试剂七工作液的配制：

取一支试剂七用2 mL试剂五溶解，得到的溶液全部转移至5 mL EP管中，补加1 mL试剂五，混匀，未使用的溶液2-8°C避光可保存3天。

④ 试剂八工作液的配制：

取一支试剂八用2 mL试剂五溶解，得到的溶液全部转移至5 mL EP管中，补加1 mL试剂五，混匀，未使用的溶液2-8°C避光可保存3天。

⑤ 500 μmol/L标准品溶液的配制

按试剂十：双蒸水=1:9体积比配制，未使用的溶液2-8°C可保存一周。

⑥ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	100	200	250	300	350	400	500
500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

乳制品样本: 将乳制品: 双蒸水: 试剂一: 试剂二: 试剂三按体积比=10:10:3.5:3.5:13进行处理, 按顺序依次加入不同试剂, 静置2 min, 4°C, 10000 \times g离心10 min, 收集上清液, 2-8°C保存待测(当天未使用的液体可放置-20°C, 一个月内使用有效)。

粪便样本: 按照粪便样本质量(g): 试剂三(mL)=1:6的比例匀浆, 4°C, 10000 \times g离心10 min, 收集上清, 2-8°C保存待测(当天未使用的液体可放置-20°C, 一个月内使用有效)。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 4.78-500 $\mu\text{mol/L}$, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
鲜牛奶1	5-10	鲜牛奶2	3-10
纯牛奶	5-10	婴儿粪便	2-6

注: 稀释液为试剂三。

操作步骤

水解反应步骤

- ① 标准管：取 50 μL 不同浓度的标准品溶液，加入相应的 EP 管中。
样本管：取 50 μL 待测样本加入相应的 EP 管中。
- ② 向步骤①中标准管加入 150 μL 试剂六工作液。
向步骤①中样本管加入 150 μL 试剂六工作液。
- ③ 涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 90 min。

显色反应步骤

- ① 标准孔：取 80 μL 水解反应步骤反应完后不同标准管中的溶液，加入到相应的酶标孔中。
测定孔：取 80 μL 水解反应步骤反应完后样本管中的溶液，加入到相应的酶标孔中。
对照孔：取 80 μL 水解反应步骤反应完后样本管中的溶液，加入到相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和测定孔加入 100 μL 试剂七工作液。
向步骤①中对照孔加入 100 μL 试剂八工作液。
- ③ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，使用荧光酶标仪设置激发波长 530 nm，发射波长 590 nm 检测各孔荧光值。

操作表

水解反应步骤

	标准管	样本管
不同浓度标准品溶液(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
试剂六工作液(μL)	150	150
涡旋混匀, 37°C 避光孵育 90 min		

显色反应步骤

	标准孔	测定孔	对照孔
标准管溶液(μL)	80	--	--
样本管溶液(μL)	--	80	80
试剂七工作液(μL)	100	100	--
试剂八工作液(μL)	--	--	100
振板 5 s, 37°C 避光孵育 30 min, 设置激发波长 530 nm, 发射波长 590 nm 检测各孔荧光值			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

乳制品样本中乳果糖含量计算公式：

$$\text{乳果糖含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta F - b}{a} \times 4^* \times f$$

粪便样本中乳果糖含量计算公式：

$$\text{乳果糖含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{kg wet weight}} \right) = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{m}{V} \times f$$

注解：

y: 标准品荧光值-空白孔荧光值 (标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-对照孔荧光值)

*: 乳制品样本处理过程中的稀释倍数, 4

f: 处理完成后的样本加入反应体系前的稀释倍数

m: 组织样本的质量, g

V: 试剂三体积, mL

附录1 关键数据

1. 技术参数

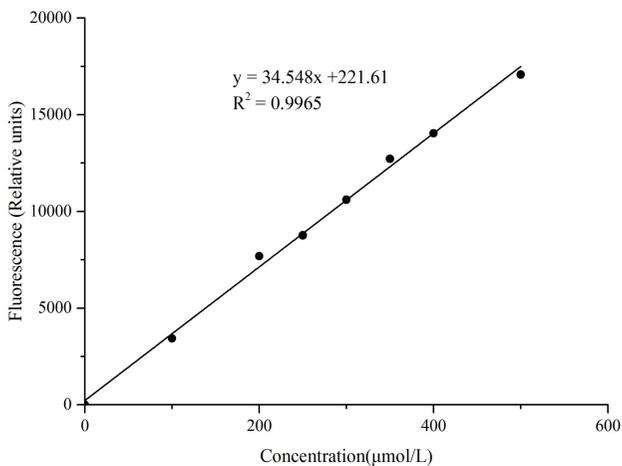
检测范围	4.78-500 $\mu\text{mol/L}$	批间差	7.4-9.7%
检测灵敏度	4.78 $\mu\text{mol/L}$	批内差	2.6-3.8%
加标回收率	91-104%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量50 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	200	250	300	350	400	500
荧光值	489	3852	8167	9078	11147	12925	14582	17542
平均荧光值	479	3915	8166	9243	11083	13197	14521	17554
绝对荧光值	0	3435	7687	8764	10604	12718	14041	17075

② 绘制标曲(如下图):



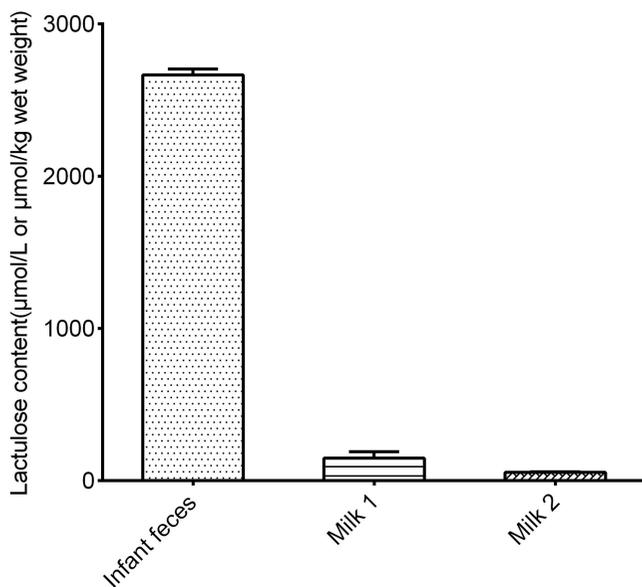
附录2 实例分析

例如检测婴儿粪便(数据仅供参考):

取50 μL 稀释三倍的婴儿粪便样本, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 34.548x + 221.61$, 测定孔平均荧光值为8056, 对照孔平均荧光值为2573, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{乳果糖含量}(\mu\text{mol/kg wet weight}) &= (8056 - 2573 - 221.61) \div 34.548 \div (1 \div 6) \times 3 \\ &= 2741.26 \mu\text{mol/kg wet weight} \end{aligned}$$

按说明书操作, 测定婴儿粪便(稀释3倍, 加样量50 μL)、牛奶1(稀释5倍, 加样量50 μL)、牛奶2(稀释5倍, 加样量50 μL)的乳果糖含量(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

