（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-K131-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(495 -510 nm)

Elabscience®乳糖酶比色法测试盒

Lactase Activity 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

本试剂盒适用于动物组织样本中的乳糖酶活力。

检测原理

乳糖酶分解乳糖产生葡萄糖，葡萄糖在酶的作用下，产生过氧化氢，在色原性氧受体的存在下，过氧化物酶催化过氧化氢,氧化色素源，生成有色物质。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

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)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	终止剂 (Stop Solution)	6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酚溶液 (Phenol Solution)	12 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶溶液 (Enzyme Solution)	12 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	50 mmol/L 葡萄糖标准品 (50 mmol/L Glucose Standard Solution)	1.5 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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：酶标仪(495 -510 nm，最佳检测波长 505 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液的配制：

试剂一用 8 mL 试剂二溶解，充分混匀，可 2-8℃保存一个月。

③ 显色剂的配制：

按试剂四：试剂五=1: 1 的比例配制，混匀，现用现配，按需配制。

④ 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(mmol/L)	**0**	**2**	**5**	**10**	**15**	**20**	**30**	**40**
50 mmol/L 标准品(μL)	0	4	10	20	30	40	60	80
双蒸水(μL)	100	96	90	80	70	60	40	20

样本准备

① 样本处理

组织样本：取 0.020-1.0 g 新鲜组织块，按照重量（g）：体积（mL）= 1: 9 的比例加入生理盐水（0.9% NaCl），进行匀浆，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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：12.5-2000 U/ mL，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠空肠组织	不稀释	10%大鼠肝组织	不稀释
10%大鼠回肠组织	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

实验关键点

严格控制酶促反应时间。

操作步骤

① 标准管：取 25 μL 不同浓度的标准品分别加入 8 个 1.5 mL EP 管中；
测定管：取 25 μL 待测样本加入 1.5 mL 的 EP 管中；
对照管：取 50 μL 试剂一工作液加入到 1.5 mL 的 EP 管中；
② 向步骤①中的标准管，测定管中加入 50 μL 试剂一工作液
③ 混匀，37℃反应 20 min
④ 向步骤①中各管加入 25 μL 试剂三
⑤ 向对照管中加入 25 μL 待测样本
⑥ 混匀，1780 × g，离心 10 min
⑦ 分别取 8 μL 上清液，加入到对应的酶标板孔中
⑧ 向各孔中加入 200 μL 显色剂
⑨ 酶标仪上振板 10 s，37℃反应 15 min
⑩ 酶标仪 505 nm 测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品(μL)	25	--	--
待测样本(μL)	--	25	--
试剂一工作液	50	50	50
混匀，37℃反应 20 min			
试剂三(μL)	25	25	25
待测样本(μL)	--	--	25
混匀，1780 × g，离心 10 min，取上清液进行显色反应			
上清液(μL)	8	8	8
显色剂(μL)	200	200	200
酶标仪上振板 10 s，37℃反应 15 min，酶标仪 505 nm 测定各孔 OD 值			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

定义： 37℃条件下，每毫克组织蛋白每分钟水解 1 nmoL 乳糖的量为一个活力单位

$$\underset{\text{U/mgprot}}{\text{乳糖酶活力}} = (\Delta A - b) \div a \div 20^{*} \times 1000^{**} \times f \div C_{pr}$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

a：标曲斜率

b：标曲截距

x：标准品的浓度

ΔA：样本的绝对 OD 值（测定孔 OD 值-对照孔 OD 值）

*：酶促反应时间为 20 min

**：1 μmol=1000 nmol

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

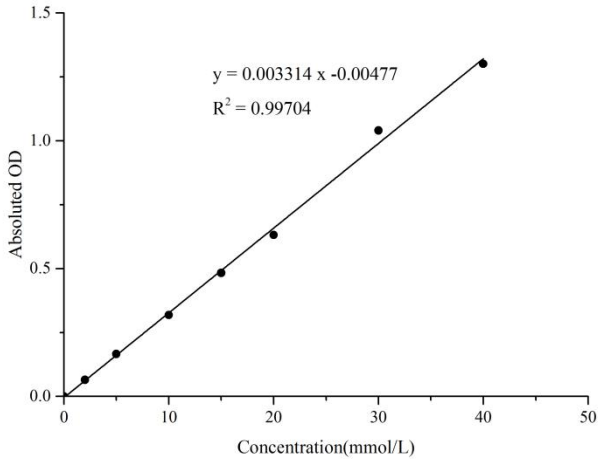
检测范围	12.5-2000 U/mL	**平均批间差**	8.5 %
灵敏度	3.94 U/mL	**平均批内差**	4.5 %
平均回收率	102 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①标准品浓度测定数据：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**2**	**5**	**10**	**15**	**20**	**30**	**40**
OD 值	0.049	0.115	0.218	0.368	0.531	0.687	1.140	1.323
	0.048	0.112	0.210	0.366	0.532	0.674	1.037	1.375
平均 OD 值	0.048	0.113	0.214	0.367	0.531	0.680	1.089	1.349
绝对 OD 值	0.000	0.065	0.166	0.319	0.483	0.632	1.040	1.301

②制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

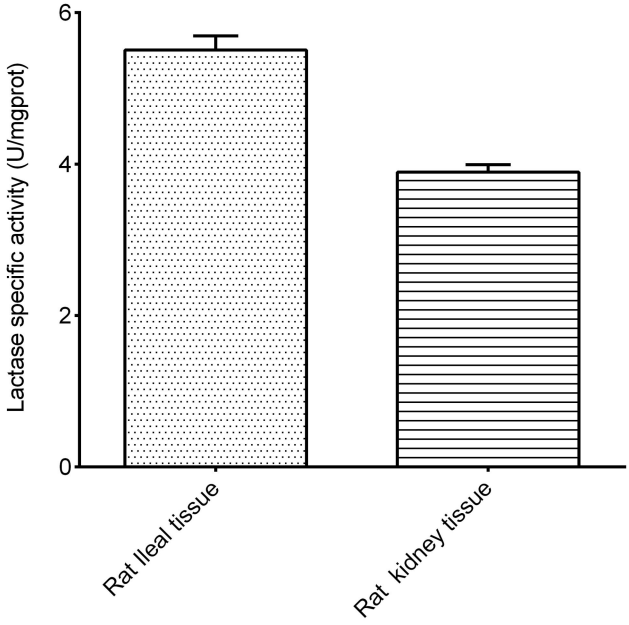
例如检测大鼠回肠组织(数据仅供参考):

取25 μL 10%大鼠回肠匀浆按操作表检测，结果如下:

标准曲线为y =0.0342 x - 0.0078，测定孔平均OD值为0.065，对照孔平均OD值为0.053，同时测得10%匀浆蛋白浓度为5.19 mgprot/mL计算结果为:

乳糖酶活力（U/mgprot） = (0.065 - 0.053+0.0078) ÷ 0.0342÷20×1000÷5.19 = 5.58 U/mgprot

按照说明书操作,测定大鼠回肠(10%组织匀浆,蛋白含量5.19 mgprot/mL,加样量25 μL)、大鼠肾组织（10%组织匀浆，蛋白含量9.50 mgprot/mL，加样量25 μL）中乳糖酶活力（如下图）:



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性	标准品浓度稀释错误	按照标准品稀释表重新标准品
	计算错误	按照计算公式进行计算
	使用过期的试剂	选择在保质期内的试剂
样本测不出值	样本酶活低	匀浆时，减少匀浆介质的比例，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

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。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. International Immunopharmacology, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12(3):489−505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. Environmental Toxicology, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. Biomolecules, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. Life sciences, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. Gene, 2020, 768(7):145288. IF:3.688