

LAKTOSE/GALAKTOSE (Schnell-)

ASSAY-PROTOKOLL

K-LACGAR

02/21

Einbeziehung eines Verfahrens zur Analyse von „laktosearmen“ oder „laktosefreien“ Proben mit hohem Monosaccharidgehalt
(Verbessertes Schnellformat)

(*115 Assays pro Kit)

* Die Anzahl der Tests pro Kit kann verdoppelt werden, wenn alle Volumina halbiert werden

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ebenfalls für die Verwendung mit der AOAC-Methode 2006.06 – Laktose in Milch geeignet.



Schulungsvideo
abspielen



NEOGEN®

Megazyme

EINFÜHRUNG:

Laktose, auch Milchzucker genannt, ist ein weißes kristallines Disaccharid. Laktose wird in den Brustdrüsen aller laktierenden Tiere gebildet und ist in ihrer Milch vorhanden. Laktose ergibt bei der Hydrolyse durch Laktase (β -Galactosidase), ein Enzym im Magensaft, D-Galaktose und D-Glukose. Menschen, denen dieses Enzym nach der Kindheit fehlt, können Milch nicht verdauen und werden als „Laktose-intolerant“ bezeichnet. Häufige Symptome einer Laktoseintoleranz sind Übelkeit, Krämpfe, Blähungen und Durchfall, die etwa 30 Minuten bis 2 Stunden nach dem Verzehr oder Trinken von laktosehaltigen Lebensmitteln oder Getränken beginnen. Zwischen 30 und 50 Millionen Amerikaner sind Laktose-intolerant, wobei bestimmte Bevölkerungsgruppen stärker betroffen sind als andere. Bis zu 75 Prozent aller Afroamerikaner und amerikanischen Ureinwohner und 90 Prozent der asiatischen Amerikaner sind Laktose-intolerant. Am seltensten tritt die Erkrankung bei Menschen nordeuropäischer Abstammung auf.

Enzymatische Verfahren zur Messung von Laktose sind gut bekannt und basieren im Allgemeinen auf der Hydrolyse von Laktose zu D-Galaktose und D-Glukose mit β -Galactosidase, gefolgt von der Bestimmung von entweder D-Galaktose oder D-Glukose. In der Methode der International Dairy Federation (79B:1991) zur Messung von Laktose in „getrockneter Milch, getrockneten Eismischungen und Schmelzkäse“ sind Einzelheiten zur Deproteinisierung von Proben, zur Hydrolyse von Laktose mit β -Galactosidase und zur Messung von freigesetzter D-Galaktose oder D-Glukose angegeben. Die Messung von Laktose als freigesetzte D-Galaktose ist im Allgemeinen zuverlässiger als die Messung über freigesetzte D-Glukose, da Zubereitungen im Allgemeinen mehr freie D-Glukose als freie D-Galaktose enthalten.

Enzym-Kits zur Bestimmung von D-Galaktose sind sehr langsam. Dies ist auf die geringe Rate der natürlichen chemischen „Mutarotation“ zwischen den α - und β -anomeren Formen von D-Galaktose zurückzuführen. Nur die β -Form wird von β -Galaktose-Dehydrogenase erkannt. In Inkubationen, die NAD⁺, D-Galaktose und β -Galaktose-Dehydrogenase enthalten, kommt es zu einem sehr schnellen anfänglichen Anstieg der Absorption aufgrund des Verzehrs von β -D-Galaktose, gefolgt von einer sehr langsamen Annäherung an den Endpunkt. Dieser sehr langsame Ansatz resultiert aus der sehr geringen Rate der chemischen „Mutarotation“ von α -D-Galaktose in β -D-Galaktose. Mithilfe von Technologie, die von Megazyme entwickelt wurde (patentiert), wurde nun eine Galaktose-Mutarotase in das Assay-Format integriert, um diesen langsamen Mutarotationsschritt schnell zu katalysieren. Das Ergebnis sind sehr schnelle Analysezeiten von ca. 5 min bei Raumtemperatur (Abbildung 1, Seite 10).

Neben der Analyse von Laktose in „normalen“ Proben eignet sich dieses Kit (K-LACGAR) auch für die Analyse von Laktose in „laktosearmen“ oder „laktosefreien“ Proben mit sehr hohem Monosaccharidgehalt (siehe Verfahren B, Seite 7).

PRINZIP:

In dem derzeit beschriebenen Verfahren (eine Modifikation der offiziellen AOAC-Methode 984.15; Laktose in Milch) wird Laktose von *Aspergillus niger* β -Galactosidase bei pH 5,0 (1) zu D-Galactose und D-Glucose hydrolysiert.



Die Interkonversion der α - und β -anomeren Formen der D-Galaktose wird durch Galaktoseemutarotase (GalM) katalysiert (2).



Die β -D-Galaktose wird bei Vorliegen von β -Galaktose-Dehydrogenase (β -GalDH) bei pH 8,6 durch NAD⁺ zu D-Galaktonsäure oxidiert.



Die Menge an NADH, die bei dieser Reaktion gebildet wird, ist stöchiometrisch mit der Menge an Laktose. Das NADH wird durch die Erhöhung der Extinktion bei 340 nm gemessen.

SPEZIFITÄT, SENSITIVITÄT, LINEARITÄT UND PRÄZISION:

Die Assays sind für Laktose und D-Galaktose spezifisch. Die kleinste differenzierende Absorption des Assays beträgt 0,010 Absorptionseinheiten. Dies entspricht 1,48 mg Lactose (oder 0,74 mg D-Galaktose)/l Probenlösung bei einem maximalen Probenvolumen von 1,00 ml. Die Nachweisgrenze liegt bei 2,96 mg Laktose/l, die sich aus einer Absorptionsdifferenz von 0,020 mit dem maximalen Probenvolumen von 1,00 ml ergibt.

Der Assay ist linear über den Bereich von 4 bis 80 μg D-Galaktose (oder 8 bis 160 μg Laktose) pro Assay. Bei Duplikatbestimmungen mit einer Probenlösung kann eine Absorptionsdifferenz von 0,005 bis 0,010 auftreten. Bei einem Probenvolumen von 1,00 ml entspricht dies einer Laktosekonzentration von ca. 0,74 bis 1,48 mg/l der Probenlösung. Wenn die Probe während der Probenvorbereitung verdünnt wird, wird das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert. Wird die Probe bei der Probenvorbereitung gewogen, z.B. 10 g/l, ist mit einer Differenz von 0,02 bis 0,05 g/100 g zu rechnen.

INTERFERENZ:

Ist die Umwandlung von D-Galaktose innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur abgeschlossen, kann im Allgemeinen davon ausgegangen werden, dass keine Interferenz aufgetreten ist. Dies kann eingehend überprüft werden, indem der Küvette nach Abschluss der Reaktion D-Galaktose (ca. 40 μg in 0,1 ml) zugesetzt wird.

Es sollte eine signifikante Erhöhung der Absorption beobachtet werden.

Störstoffe in der zu analysierenden Probe können durch Verwendung eines internen Standards identifiziert werden. Eine quantitative Rückgewinnung dieses Standards wäre zu erwarten. Verluste bei der Probenhandhabung und -Extraktion werden durch die Durchführung von Rückgewinnungsexperimenten identifiziert, d. h. durch Zugabe von Laktose oder D-Galaktose zur Probe in den ersten Extraktionsschritten.

Um zu bestätigen, dass die Laktose vollständig durch β -Galaktosidase hydrolysiert wird, führen Sie die Inkubation für die empfohlene Zeit und für das Doppelte der empfohlenen Inkubationszeit durch. Die endgültigen ermittelten Laktosewerte sollten identisch sein.

Da zweiwertige Metallionen die in diesem Assay verwendete β -Galaktose-Dehydrogenase hemmen, ist EDTA in Puffer 2 enthalten.

SICHERHEIT:

Die allgemeinen Sicherheitsmaßnahmen, die für alle chemischen Stoffe gelten, sollten eingehalten werden.

Weitere Informationen zur sicheren Verwendung und Handhabung dieses Produkts finden Sie im zugehörigen Sicherheitsdatenblatt, das auf der Megazyme-Website verfügbar ist.

KITS:

Kits für die Durchführung von 115 Assays sind bei Megazyme erhältlich. Die Kits enthalten die vollständige Assay-Methode plus:

Flasche 1: Puffer (2,5 ml, pH 5,0).

Stabil für > 2 Jahre bei 4 °C.

Flasche 2: Puffer (25 ml, pH 8,6) plus EDTA und Natriumazid (0,02 % w/v)

als Konservierungsmittel.

Stabil für > 2 Jahre bei 4 °C.

Flasche 3: NAD⁺.

Stabil für > 5 Jahre unter -10 °C.

Flasche 4: β -Galactosidase-Suspension (1,2 ml).

Stabil für > 4 Jahre bei 4 °C.

Flasche 5: β -Galaktose-Dehydrogenase plus Galaktose-Mutarotase-Suspension, 2,4 ml.

Stabil für > 2 Jahre bei 4 °C.

Flasche 6: D-Galactose-Standardlösung (5 ml, 0,4 mg/ml in 0,02 % w/v Natriumazid).

Stabil für > 2 Jahre; Verschlossen bei 4 °C lagern.

HERSTELLUNG VON REAGENZIENLÖSUNGEN/SUSPENSIONEN:

1. Verdünnen Sie den Inhalt der Flasche 1 in 24 ml destilliertem Wasser. Verwenden Sie diese Lösung, um den gesamten Inhalt von Flasche 4 zu verdünnen. Sofort verwenden.
2. Verwenden Sie den Inhalt von Flasche 2 wie geliefert. Stabil für > 2 Jahre bei 4 °C.
3. Lösen Sie den Inhalt der Flasche 3 in 12 ml destilliertem Wasser. **Stabil für ~ 4 Wochen bei 4 °C** oder stabil für > 2 Jahre unter -10 °C (um wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden, in angemessen große Aliquots aufteilen und in Polypropylenröhrchen lagern).
4. Den Inhalt von Flasche 4 (1,2 ml) auf die 24 ml verdünnten Puffer in Flasche 1 übertragen. Das ist nun Lösung 4. In angemessen große Aliquots aufteilen. Zwischen Verwendungen in Polypropylenbehältern unter -10 °C aufbewahren und nach Möglichkeit während der Verwendung kühlen. Stabil für > 2 Jahre unter -10 °C.
5. Verwenden Sie den Inhalt von Flasche 5 wie geliefert. Die Flasche vor dem ersten Öffnen schütteln, um alle Proteine zu entfernen, die sich möglicherweise auf dem Gummistopfen abgesetzt haben. Die Flasche anschließend in aufrechter Position lagern. **Die Flasche vor der Verwendung schwenken, um den Inhalt zu vermischen.** Stabil für > 2 Jahre bei 4 °C.
6. Verwenden Sie den Inhalt von Flasche 6 wie geliefert. Stabil für > 2 Jahre; Verschlossen bei 4 °C lagern.

AUSRÜSTUNG (EMPFOHLEN):

1. Mischzylinder (50 ml, 100 ml und 500 ml).
2. Einweg-Kunststoffküvetten (1 cm Strahlengang, 3,0 ml).
3. Mikropipettierer, z. B. Gilson Pipetman® (20 µl und 200 µl).
4. Direktverdränger-Pipettierer, z. B. Eppendorf Multipette®
 - mit 5,0 ml Combitip® (zur Abgabe von 0,2-ml-Aliquots verdünnter β-Galaktosidase, Puffer 1 und 0,1-ml-Aliquots NAD⁺ -Lösung).
 - mit 25 ml Combitip® (zur Abgabe von 2,0-ml-Aliquoten destilliertem Wasser).
5. Laborwaage.
6. Spektralphotometer, auf 340 nm eingestellt.
7. Vortexer (z. B. IKA® Yellowline Test Tube Shaker TTS2).
8. Stoppuhr.
9. Whatman No. 1 (9 cm) Papierfilter.

VERFAHREN A: (Standard-Assay-Verfahren)

Wellenlänge: 340 nm
Küvette: 1 cm Strahlengang (Glas oder Kunststoff)
Temperatur: ~ 25 °C
Endgültiges Volumen: 2,72 ml
Probenlösung: 4-80 µg D-Galaktose (oder 8-160 µg Laktose) pro Küvette
 (in 0,20-1,00 ml Probenvolumen)

AbleSEN GEGEN LUFT (ohne Küvette im Strahlengang) oder gegen Wasser

In Küvetten pipettieren	Laktose		Galaktose	
	Blind	Probe	Blind	Probe
Probenlösung Lösung 4 (β -Galaktosidase)	- 0,20 ml	0,20 ml 0,20 ml	- -	0,20 ml -
Sicherstellen, dass alle Lösungen auf den Boden der Küvette gegeben werden. Den Inhalt durch leichtes Schwenken mischen, die Küvetten verschließen und 10 min bei ~ 25 °C inkubieren. Hinzugeben:				
destilliertes Wasser (bei ~ 25 °C) Lösung 2 (Puffer) Lösung 3 (NAD^+)	2,20 ml 0,20 ml 0,10 ml	2,00 ml 0,20 ml 0,10 ml	2,40 ml 0,20 ml 0,10 ml	2,20 ml 0,20 ml 0,10 ml
Mischen*, den Absorptionsgrad der Lösungen (A_1) nach ca. 3 min ablesen und die Reaktionen durch Zugabe der folgenden Stoffe starten:				
Suspension 5 (β -GalDH/GaIM)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Mischen*, den Absorptionsgrad der Lösungen (A_2) am Ende der Reaktion ablesen (< 5 min). Wenn die Reaktion nach 6 Minuten nicht gestoppt wurde, lesen Sie die Absorptionsgrade in Abständen von 1 Minute weiter ab, bis die Absorptionsgrade über 1 min** hinweg gleich bleiben.				

* z.B. mit einem Kunststoffspatel oder durch sanftes Umdrehen nach dem Verschließen der Küvette mit einer Küvettenkappe oder Parafilm®.

** Wenn der Absorptionsgrad A_2 konstant zunimmt, extrapoliert man den Absorptionsgrad auf den Zeitpunkt der Zugabe von Suspension 5 (β -GalDH/GaIM).

BERECHNUNG:

Die Absorptionsdifferenzen ($A_2 - A_1$) für Blindproben und Proben bestimmen.
 Die Absorptionsdifferenz der Blindprobe wird von der Absorptionsdifferenz der entsprechenden Probe subtrahiert, wodurch die sich aus der Probe ergebende Änderung des Absorptionsgrads (ΔA) wie folgt erhalten wird:

Bestimmung der D-Galaktose:

$$\Delta A_{D\text{-Galaktose}} = (A_2 - A_1)_{\text{Galaktoseprobe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Galaktose-Blindprobe}}$$

Bestimmung von Laktose + D-Galaktose:

$$\Delta A_{\text{Laktose} + \text{D-Galaktose}} = (A_2 - A_1)_{\text{Laktoseprobe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Laktose-Leerprobe}}$$

Bestimmung der Laktose:

$$\Delta A_{\text{Laktose}} = \Delta A_{\text{Laktose} + \text{D-Galaktose}} - \Delta A_{D\text{-Galaktose}}$$

Die Werte von $\Delta A_{D\text{-Galaktose}}$ und $\Delta A_{\text{Laktose} + \text{D-Galaktose}}$ sollten in der Regel mindestens 0,100 Absorptionseinheiten betragen, um ausreichend genaue Ergebnisse zu erhalten. Bei Milch ist der D-Galaktose-Gehalt jedoch sehr gering.

Die Konzentration von D-Galaktose und Laktose kann wie folgt berechnet werden:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/l}]$$

wobei:

V = endgültiges Volumen [ml]

MW = Molekulargewicht des untersuchten Stoffes [g/mol]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm
 $= 6300 \text{ [l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

d = Strahlengang [cm]

v = Probenvolumen [ml]

Für D-Galaktose gilt:

$$c = \frac{2,72 \times 180,16}{6300 \times 1 \times 0,2} \times \Delta A_{D\text{-Galaktose}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,3889 \times \Delta A_{D\text{-Galaktose}} \quad [\text{g/l}]$$

für Laktose:

$$c = \frac{2,72 \times 342,3}{6300 \times 1 \times 0,2} \times \Delta A_{\text{Laktose}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,7389 \times \Delta A_{\text{Laktose}} \quad [\text{g/l}]$$

Wurde die Probe während der Vorbereitung verdünnt, ist das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei der Analyse von festen und halbfesten Proben, die für die Probenvorbereitung abgewogen werden, wird der Gehalt (g/100 g) an D-Galaktose oder Laktose aus der gewogenen Menge wie folgt berechnet:

$$= \frac{C \text{ [g/l Probenlösung]} \times 100}{\text{Gewicht}_{\text{Probe}} \text{ [g/l Probenlösung]}} \text{ [g/100 g]}$$

HINWEIS: Diese Berechnungen können durch die Verwendung des Megazyme **Mega-Calc™** vereinfacht werden, der im Produktbereich auf der Megazyme-Website (www.megazyme.com) heruntergeladen werden kann.

VERFAHREN B: (Für „laktosearme“ oder „laktosefreie“ Proben mit hohem Monosaccharidgehalt)

Schritt 1:

1 ml Milch (oder homogenisierte Probe) in 4 ml Wasser geben, mischen und 1 ml 10 mg/ml Natriumborhydrid (gelöst in 50 mM NaOH und weniger als 5 Stunden alt) hinzugeben. Diese Lösung in einem verschlossenen Kunststoffbehälter bei 40 °C 30 Minuten lang inkubieren und daraufhin durch Zugabe von 2,5 ml 0,2 M Essigsäure neutralisieren. Durch Whatman No. 1 Papierfilter oder Zentrifuge in einer Mikrofuge bei 13.000 x g filtrieren und das Filtrat oder den Überstand direkt im Assay oder nach geeigneter Verdünnung in destilliertem Wasser (falls erforderlich) verwenden. Das Filtrat wird trüb sein; dies ist im Assay jedoch stabil und trägt nur sehr wenig zur Absorption bei. *Üblicherweise ein Probenvolumen von 0,2 ml für Schritt 2 verwenden.*

Schritt 2:

Wellenlänge: 340 nm
Küvette: 1 cm Strahlengang (Glas oder Kunststoff)
Temperatur: ~ 25 °C
Endgültiges Volumen: 2,72 ml
Probenlösung: 4-80 µg D-Galaktose (oder 8-160 µg Laktose)
 Pro Küvette (in 0,20-1,00 ml Probenvolumen)

AbleSEN gegen Luft (ohne Küvette im Strahlengang) oder gegen Wasser

In Küvetten pipettieren	Laktose		Galaktose	
	Blind	Probe	Blind	Probe
Probenlösung	-	0,20 ml	-	0,20 ml
Lösung 4 (β -Galaktosidase)	0,20 ml	0,20 ml	-	-
Sicherstellen, dass alle Lösungen auf den Boden der Küvette gegeben werden. Den Inhalt durch leichtes Schwenken mischen, die Küvetten verschließen und 2 Stunden bei ~ 25 °C inkubieren. Hinzugeben:				
destilliertes Wasser (bei ~ 25 °C) Lösung 2 (Puffer) Lösung 3 (NAD+)	2,20 ml 0,20 ml 0,10 ml	2,00 ml 0,20 ml 0,10 ml	2,40 ml 0,20 ml 0,10 ml	2,20 ml 0,20 ml 0,10 ml
Mischen*, den Absorptionsgrad der Lösungen (A1) nach ca. 3 min ablesen und die Reaktionen durch Zugabe der folgenden Stoffe starten:				
Suspension 5 (β -GalDH/GaLM)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Mischen*, den Absorptionsgrad der Lösungen (A2) am Ende der Reaktion ablesen (< 5 min). Wenn die Reaktion nach 6 Minuten nicht gestoppt wurde, lesen Sie die Absorptionsgrade in Abständen von 1 Minute weiter ab, bis die Absorptionsgrade über 1 min** hinweg gleich bleiben.				

* z.B. mit einem Kunststoffspatel oder durch sanftes Umdrehen nach dem Verschließen der Küvette mit einer Küvettenkappe oder Parafilm®.

** Wenn der Absorptionsgrad A₂ konstant zunimmt, extrapoliert man den Absorptionsgrad auf den Zeitpunkt der Zugabe von Suspension 5 (β -GalDH/GaLM).

BERECHNUNG: (Verfahren B)

Die Berechnung der Ergebnisse für Verfahren B ist die gleiche wie für Verfahren A (siehe Seite 5 und 6). Der Verdünnungsfaktor von **8,5** aus Schritt 1 von Verfahren B muss jedoch, ebenso wie eine etwaige weitere Verdünnung der Probe vor Schritt 2, berücksichtigt werden.

PROBENVORBEREITUNG:

1. Probenverdünnung.

Die Menge an D-Galaktose in der Küvette (d. h. in den 0,2 ml der zu analysierenden Probe) sollte zwischen 4 und 80 µg liegen (d. h. die Laktose in der verwendeten Probenlösung sollte zwischen ca. 8 und 160 µg liegen). Die Probenlösung muss daher so weit verdünnt werden, dass eine Laktosekonzentration zwischen 0,04 und 0,80 g/l erreicht wird.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Konzentration von Lactose (g/l)	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor (F)
< 0,8	Keine Verdünnung erforderlich	1
0,8-8,0	1 + 9	10
8,0-80	1 + 99	100
> 80	1 +999	1000

Wenn der Wert von $\Delta A_{\text{D-Galaktose}}$ oder $\Delta A_{\text{Laktose}} + \text{D-Galaktose}$ zu niedrig ist (z. B. < 0,100), mehr Probe abwiegen oder weniger stark verdünnen. Alternativ kann das Probenvolumen, das in die Küvette pipettiert werden soll, auf bis zu 1,00 ml erhöht werden, wobei sichergestellt wird, dass die Summe aus der Probe, dem destillierten Wasser und den 4 Komponenten der Lösung in der Reaktion 2,40 ml beträgt, und das neue Probenvolumen in der Gleichung verwendet wird.

2. Klärung der Probe.

a. Lösungen:

Carrez I Lösung. 3,60 g Kaliumhexacyanoferrat (II) lösen {K₄[Fe(CN)₆].3H₂O} (Sigma Kat.-Nr. P9387) in 100 ml destilliertem Wasser erhitzen. Bei Raumtemperatur lagern.

Carrez II Lösung. 7,20 g Zinksulfat (ZnSO₄.7H₂O) (Sigma Kat.-Nr. Z4750) in 100 ml destilliertem Wasser erhitzen. Bei Raumtemperatur lagern.

Natriumhydroxid (NaOH, 100 mM). 4 g NaOH in 1 l destilliertem Wasser lösen. Bei Raumtemperatur lagern.

b. Verfahren:

1 ml der flüssigen Probe in einen 100-ml-Mischzylinder pipettieren, der ca. 60 ml destilliertes Wasser enthält oder eine angemessene Menge der Probe in einen 100-ml-Mischzylinder pipettieren und 60 ml destilliertes Wasser hinzugeben. Vorsichtig 5 ml Carrez I-Lösung, 5 ml Carrez II-Lösung und 10 ml NaOH-Lösung (100 mM) hinzugeben. Nach jeder Zugabe mischen. Den Mischzylinder bis zur Markierung füllen, mischen und filtrieren.

3. Allgemeine Überlegungen.

- (a) **Flüssige Proben:** Klare, leicht gefärbte und annähernd neutrale, flüssige Proben können direkt im Assay verwendet werden.
- (b) **Saure Proben:** Wenn > 0,1 ml einer sauren Probe unverdünnt verwendet werden sollen (z. B. Wein oder Fruchtsaft), sollte der pH-Wert der Lösung mit 2 M NaOH auf ca. 8,6 erhöht und die Lösung 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert werden.
- (c) **Kohlendioxid:** Proben mit signifikantem Kohlendioxidegehalt, wie z. B. Bier, sollten durch Erhöhung des pH-Werts auf ca. 8,6 mit 2 M NaOH und leichtem Rühren oder durch Rühren mit einem Glasstab entgast werden.
- (d) **Farbige Proben:** Bei farbigen Proben kann eine zusätzliche Blindprobe, d.h. eine Probe ohne β -GalDH/GalM, erforderlich sein.
- (e) **Stark farbige Proben:** Bei unverdünnter Verwendung sollten stark farbige Proben durch Hinzugabe von 0,2 g Polyvinylpolypyrrrolidon (PVPP)/10 ml Probe behandelt werden. Die Tube 5 Minuten lang kräftig schütteln und durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren.
- (f) **Feste Proben:** Feste Proben in destilliertem Wasser homogenisieren oder zerstoßen und gegebenenfalls filtrieren.
- (g) **Fetthaltige Proben:** Diese Proben mit heißem Wasser bei einer Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes extrahieren, z. B. in einem 100-ml-Mischzyylinder bei 60 °C. Auf Raumtemperatur bringen und den Mischzyylinder bis zur Markierung mit Wasser füllen. 15-30 Minuten auf Eis oder im Kühlschrank lagern, um die Trennung des Fettes zu ermöglichen, daraufhin filtrieren. Die ersten ml Filtrat entsorgen und den klaren Überstand (der leicht schillern könnte) für das Assay verwenden. Alternativ mit Carrez-Reagenzien klären.
- (h) **Proteinhaltige Proben:** Proteinhaltige Proben durch Zugabe eines gleichen Volumens eiskalter 1 M Perchlorsäure durch Mischen deproteinisieren. Bei 1.500 g 10 min lang zentrifugieren und den Überstand mit 1 M KOH neutralisieren. Alternativ mit Carrez-Reagenzien klären.

BEISPIELE FÜR DIE PROBENVORBEREITUNG:

- (a) **Bestimmung der Laktose in Milch, Sahne oder Joghurt.** Ca. 1 g Milch, Sahne, Joghurt oder Kondensmilch präzise in einen 100-ml-Mischzyylinder abwiegen, ca. 60 ml destilliertes Wasser zugeben, mischen und 15 min lang bei 50 °C unter gelegentlichem Schwenken lagern. 2 ml Carrez I Lösung hinzufügen und mischen. 2 ml Carrez II Lösung hinzufügen und mischen. 4 ml 100 mM NaOH-Lösung hinzufügen und kräftig mischen. Mit destilliertem Wasser verdünnen und gründlich mischen.

Ein Aliquot der Lösung durch Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren. Die ersten Milliliter des Filtrats entsorgen. Das klare Filtrat (Probenlösung) im Assay verwenden. *In der Regel ist für Milch, Sahne und Joghurt keine Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend. Für Kondensmilch ist eine Verdünnung von 1:3 und ein Probenvolumen von 0,2 ml ausreichend.*

(b) Bestimmung der Laktose in Käse und Schokolade.

10 g geriebenen Käse oder 0,5 g geriebene Schokolade in ein 200-ml-Becherglas geben. Ca. 60 ml destilliertes Wasser und einen Rührstab hinzufügen und mit einem Magnetrührer bei 50 °C ca. 15 Min. mischen. 2 ml Carrez I Lösung hinzufügen und mischen. 2 ml Carrez II Lösung hinzufügen und mischen. 4 ml 100 mM NaOH-Lösung hinzufügen und kräftig mischen. Lösung quantitativ in einen 100-ml-Messkolben übertragen und mit destilliertem Wasser verdünnen. Gründlich mischen und ein Aliquot der Lösung durch Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren. Die ersten Milliliter des Filtrats entsorgen. Das klare Filtrat (Probenlösung) im Assay verwenden. *In der Regel ist für Schokolade und die meisten Käsesorten keine Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend. Für roten Cheddar-Käse sind jedoch eine Verdünnung von 1:10 und ein Probenvolumen von 0,2 ml ausreichend.*

REFERENZ:

Beutler, H. O. (1988). Lactose and D-Galactose. „*Methods of Enzymatic Analysis*“ (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., **Vol. VI**, pp. 104- 112, VCH Publishers (UK) Ltd, Cambridge, UK.

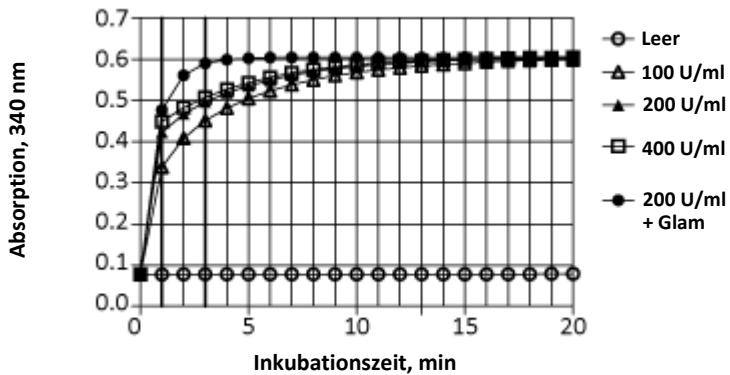


Abbildung 1. Wirkung von Galaktosemutarotase auf die Oxidationsrate von D-Galaktose durch β D-Galaktose-Dehydrogenase. Inkubationen wurden mit 20 μ l D-Galaktose-Dehydrogenase β bei 100, 200 und 400 U/ml und mit β D-Galaktose-Dehydrogenase (200 U/ml) plus Galaktose-Mutarotase durchgeführt, wie angegeben.



Kontaktieren Sie uns für weitere Informationen: neogen.com/contact

Ohne Gewähr

Die in diesem Assay-Protokoll enthaltenen Informationen sind nach bestem Wissen und Gewissen wahr und genau. Da die Verwendungsbedingungen jedoch außerhalb unserer Kontrolle liegen, besteht keine gewährte oder implizierte Gewährleistung hinsichtlich der abgegebenen Empfehlungen oder Vorschläge. Ebenso wird nicht gewährleistet, dass durch die Verwendung keine Patentverletzungen auftreten. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, vor dem routinemäßigen Einsatz eine interne Matrixvalidierung durchzuführen.