

**TEST PROSEDÜRÜ :****Düşük laktozlu veya laktozsuz süt için standart tahlil prosedürü:****NOTLAR:**

Bölüm C'deki numune hacimleri 0,4 mL'yi geçmemelidir, çünkü daha yüksek seviyelerde numunedeki serbest D-galaktoz  $\beta$ -galaktosidaz'ı inhibe eder. Düşük laktozlu veya laktozsuz süt dışındaki numuneler için "Numune Hazırlama" bölümlerine bakın.

**A. Örnek hazırlama:**

1,5 mL polipropilen mikrofüj tüpüne pipetleyin	Hacim
Damıtılmış su (~ 25°C'de)	0.90 mL
Süt örneği	0.50 mL
* Konsantre Carrez II solüsyonu	0.05 mL
* Konsantre Carrez I solüsyonu	0.05 mL

Tüpü kapatın, vorteksle karıştırın ve ardından 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjleyin. **Bölüm B'de kullanmak için süpernatantı dikkatlice pipetleyin.**

**NOTLAR:**

K-CARREZ numune arıtma kiti, numune hazırlama adımını gerçekleştirmek için kullanılabilir. Megazyme web sitesinde bulunan K-CARREZ için test protokolüne bakın.

**B. Glikoz oksidaz/katalaz ön işlemleri**

13 mL'lik bir polipropilen tüpe pipetleyin	Hacim
Damıtılmış su (~ 25°C'de)	0.40 mL
Berrak süpernatant (bölüm A'dan)	1.00 mL
Çözüm 1 (Tampon A)	0.10 mL
Süspansiyon 2 (GOX/katalaz karışımı)	0.20 mL
* Hidrojen peroksit (%30 w/w)	0.10 mL

Derhal tüplerin kapağını kapatın, içeriği bir vorteks karıştırıcıda karıştırın ve oda sıcaklığında (~ 22°C) 15 dakika inkübe edin. 15 dakika sonra, basıncı boşaltmak için kapağı yavaşça gevşetin ve tekrar sıkın. 100°C kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edin. Çözeltiyi 1,5 mL'lik bir mikrofüj tüpüne aktarın ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjleyin. **"Enzimatik Belirleme Reaksiyonu"nda "numune solüsyonu" olarak kullanmak için 0,1 mL şeffaf süpernatantı dikkatlice pipetleyin.**

**NOTLAR:**

13.000 rpm'ye ulaşabilen önerilen santrifüj mevcut değilse, Whatman Tip I (veya eşdeğeri) filtre kağıdı veya şırınga filtresi kullanılarak filtrasyon da mümkündür.

## TEST PROSEDÜRÜ :

## C. Enzimatik belirleme reaksiyonu:

- Dalga boyu : 340 nm
- Küvet : 1 cm ışık yolu (cam veya plastik; 1,5 mL yarı mikro)
- Sıcaklık : 25°C
- Nihai Hacim : 1,17 mL (D-glikoz); 1,19 mL (laktoz)
- Numune Solüsyonu : Küvet başına 0,5-25 µg D-glikoz veya 1-50 µg laktoz (0,1-0,4 mL numune hacminde)
- Havaya karşı okuma : (ışık yolunda küvet olmadan) veya suya karşı okuyun

## NOTLAR:

Numune grubu başına yalnızca bir "Kör" (Kör Reaktif) tahlili gereklidir.

Küvetlere pipetleyin	Boş	Numune
Damıtılmış su (~ 25°C'de) Örnek çözümü (bkz. bölüm B) Çözüm 3 (Tampon B) Çözüm 4 (NADP+/ATP)	0.90 mL	0.90 mL
Karıştırın*, yaklaşık 3 dakika sonra solüsyonların (A1) absorbanlarını okuyun ve aşağıdakileri ekleyerek reaksiyonu başlatın:		
Süspansiyon 5 (HK/G-6-PDH/6-PGDH)	0.02 mL	0.02 mL
Karıştırın* ve reaksiyonun sonunda (yaklaşık 10 dakika) solüsyonların (A2) absorbanını okuyun. <b>Sonra Ekleyin:</b>		
Süspansiyon 6 (β-galaktosidaz)	0.02 mL	0.02 mL
Karıştırın* ve reaksiyonun sonunda (15 dakika) çözeltilerin (A3) absorbanını okuyun.		

## NOTLAR:

Düşük laktozlu ve laktozsuz numuneler için, 15 dk.'lık reaksiyondan sonra tam olarak 5 dakikalık aralıklarla absorban değerini okumaya devam edin.

Süspansiyon 6 eklendikten tam olarak 20 dakika ve 25 dakika sonra okumaları alın.

Absorbans okumalarını Megazyme web sitesinden indirilebilen Megazyme Mega-Calc™ üzerindeki "Sürünme Hesaplayıcı" sekmesine girin.

Bu hesaplayıcının kullanılması sadece laktozun daha doğru ölçülmesini sağlar ve bazı GOS parazitlerini ortadan kaldırır.