

D-乳酸含量 (D-lactic acid, D-LA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T017 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法: D-乳酸在 D-乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸, 并使 NAD^+ 还原生成 NADH; 为了使该反应顺利进行另添加酶进一步分解丙酮酸; 生成 NADH 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的物质, 通过检测该物质在 450nm 的增加量, 进而计算出 D-乳酸含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体×1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 试剂三溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 1 支	4°C 保存	1. 临用前加 1.1ml 蒸馏水; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C 避光保存	
试剂五	粉剂×2 支	-20°C 避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	液体×1 支	4°C 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 0.1g 组织样本, 加 1mL 的提取液研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 离心 10min, 上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

- ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 于 4°C, 12000g 离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按细菌/细胞数量(10^4 个): 提取液(mL)为 1000~5000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样品: a. 近似中性的液体样品可直接取 1mL 转移到 EP 管中; 12000rpm, 离心 10min, 上清液

待测。

b.酸性液体样本，则需先用 KOH (5M) 调溶液的 PH 值至约 8，并在室温下孵育 30 分钟。

取 1mL 转移到 EP 管中；12000rpm，离心 10min，上清液待测。

④ 血清样本：澄清的血清样本可以直接检测。

2、检测步骤：

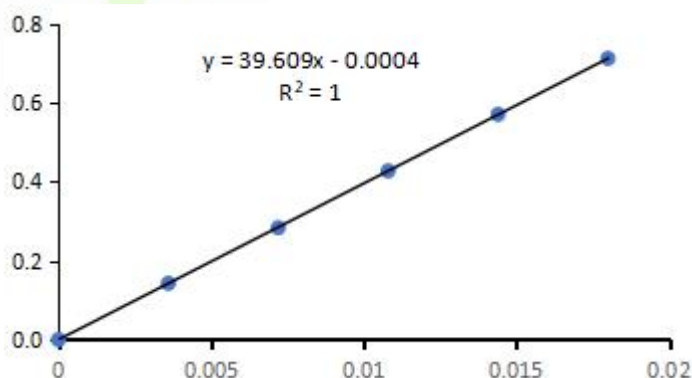
- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- ② 临用前试剂一、二、三、四可按照比例 40:20:540:20 混成混合液（用多少配多少量），下步加样表中直接加 620μL 混合液。
- ③ 所有试剂解冻至室温（25℃）或在水浴锅（25℃）中孵育 10min，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白对照(仅做一个)
样本	60	0
试剂一	40	40
试剂二	20	20
试剂三	540	600
试剂四	20	20
试剂五	20	20
混匀，立即于 37℃条件下避光反应 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【注】1. 若样本自身有很强的背景值（如颜色很深或含有还原性物质如抗坏血酸等），可以加设一个样本自身对照：即试剂五用蒸馏水替代，其他试剂保持不变，则 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。
2. 若 ΔA 值较小，可增加样本上样量 V1（如增至 100μL，则试剂三相应减少），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
3. 若 ΔA 值较大，或 A 测定超过了标曲最高点，可对样本用蒸馏水稀释；或减少样本上样量 V1（如减至 20μL，则试剂三相应增加），则稀释倍数 D 和改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 39.609x - 0.0004$ ；x 为标准品摩尔质量 (μmol)，y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{D-乳酸含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0004) \div 39.609] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 11.7346 \times (\Delta A + 0.0004) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{D-乳酸含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0004) \div 39.609] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 11.7346 \times (\Delta A + 0.0004) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按照细菌/细胞计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0004)\div 39.609]\div (500\times V1\div V)\times D$$

$$=0.023\times (\Delta A+0.0004)\times D$$

5、按照液体体积计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0004)\div 39.609]\div V1\times D=11.7346\times (\Delta A+0.0004)\times D$$

6、按照血清体积计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0004)\div 39.609]\div V1\times D=11.7346\times (\Delta A+0.0004)\times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.06mL；

W---样本质量，g；

500---细胞数目，万；

D-乳酸分子量 Mr---90.08；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 临用前取 1mL 蒸馏水至 2mLEP 管中，再向 1mL 蒸馏水中加入 3μL 的标准品，混匀，即得标准品母液浓度为 30μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 3μmol/mL 的标品稀释液；						
2. 吸取 3μmol/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.3μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	60	
蒸馏水		60
试剂一	40	40
试剂二	20	20
试剂三	540	540
试剂四	20	20
试剂五	20	20
混匀，立即于 37℃条件下避光反应 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		