

## D-乳酸含量 (D-lactic acid, D-LA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-T017 微板法 96 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  $\text{NAD}^+$  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 120mL×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 20mL×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 (可手动甩一甩); 2. 每支分别加 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 临用前试剂一、二、三、四可按照比例 20:10:130:10 混成混合液（用多少配多少量），下步加样表中直接加 170μL 混合液。

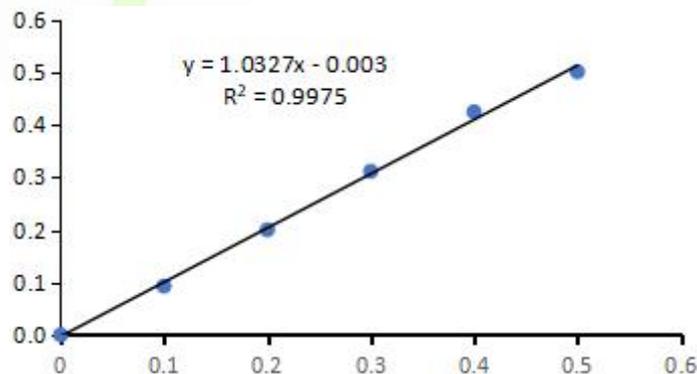
③ 所有试剂解冻至室温（25℃）或在水浴锅（25℃）中孵育 10min，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管(仅做一个)
样本	20	0
试剂一	20	20
试剂二	10	10
试剂三	130	150
试剂四	10	10
试剂五	10	10
混匀，立即于 37℃ 条件下避光反应 30min， 于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

- 【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  $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ 。
2. 若  $\Delta A$  值较小，可增加样本上样量  $V_1$ （如增至 40μL，则试剂三相应减少），则改变后的  $V_1$  需代入计算公式重新计算。
3. 若  $\Delta A$  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，则稀释倍数 D 需代入公式计算；或减少样本上样量  $V_1$ （如减至 10μL，则试剂三相应增加），则改变后  $V_1$  需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 1.0327x - 0.003$ ；x 为标准品摩尔浓度（μmol/mL），y 为  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.003) \div 1.0327 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) = 9.7 \times (\Delta A + 0.003) \div W$$

3、按蛋白浓度计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A + 0.003) \div 1.0327 \times V_2] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) = 9.7 \times (\Delta A + 0.003) \div C_{pr}$$

4、按细菌/细胞密度计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.003) \div 1.0327 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) = 9.7 \times (\Delta A + 0.003) \div 500$$

5、按照液体体积计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/mL})=[(\Delta A+0.003)\div 1.0327\times V2]\div V1=9.7\times(\Delta A+0.003)$$

6、按照血清体积计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/mL})=[(\Delta A+0.003)\div 1.0327\times V2]\div V1=9.7\times(\Delta A+0.003)$$

V---加入提取液体积， 1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积， 0.02mL；

V2---反应体系总体积， 0.2mL；

W---样本质量， g；

500---细菌/细胞数量， 万；

D---稀释倍数， 未稀释即为 1；

D-乳酸分子量 Mr---90.08。

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 3 $\mu$ L 的标准品， 混匀， 即得标准品母液浓度为 30 $\mu$ mol/mL。 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品， 例如： 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu$ mol/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 30uL， 加入 870uL 蒸馏水， 混匀得到 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液；						
1. 吸取 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液 500uL， 加入 500uL 蒸馏水， 混匀得到 0.5 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu$ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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 ( $\mu$ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	20	20
试剂二	10	10
试剂三	130	130
试剂四	10	10
试剂五	10	10
混匀， 立即于 37 $^{\circ}$ C 条件下避光反应 30min， 于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		