

D-乳酸含量 (D-lactic acid, D-LA) 试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

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 处有最大吸收峰的有色物质, 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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.1mL 试剂三溶解备用。
试剂二	液体 1.1mL×1 支	4°C 保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C 保存	
试剂五	液体 μL ×2 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	液体 μL ×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、研钵、离心机。

四、D-乳酸 (D-LA) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- 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、上机检测:

- 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 620 μL 混合液。

- ③ 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或在水浴锅 (25°C) 中孵育 10min, 在 1mL 玻璃比

色皿（光径 1cm）中依次加入：

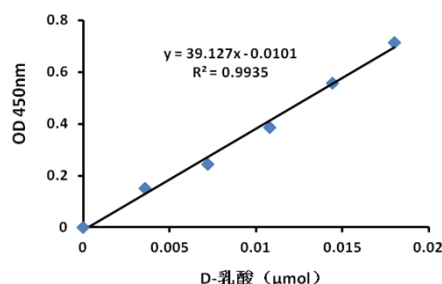
试剂名称（ μL ）	测定管	空白对照(仅做一个)
样本	60	0
试剂一	40	40
试剂二	20	20
试剂三	540	600
试剂四	20	20
试剂五	20	20

混匀，立即于 37°C 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 100 μL ，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 20 μL ，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： $y = 39.127x - 0.0101$ ；x 为标准品摩尔质量（ μmol ），y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{D-乳酸含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.43 \times (\Delta A + 0.0101) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照细菌/细胞计算：

$$\begin{aligned} \text{D-乳酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.0009 \times (\Delta A + 0.0101) \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{D-乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div V1 \times D = 0.43 \times (\Delta A + 0.0101) \times D$$

5、按照血清体积计算：

$$\text{D-乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div V1 \times D = 0.43 \times (\Delta A + 0.0101) \times D$$

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 制备标准品母液（30 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：临用前取 1mL 蒸馏水至 2mLEP 管中，再向 1mL 蒸馏水中加入 3 μL 的标准品，混匀，即得标准品母液浓度为 30 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3. $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。