

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

(微板法 96 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  $\text{NAD}^+$  还原生成  $\text{NADH}$ ; 为了使该反应顺利进行另添加酶进一步分解丙酮酸; 生成  $\text{NADH}$  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 120mL×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 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 $\mu\text{L}$ ×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 $\mu\text{L}$ ×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:

酶标仪、96 孔板、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:

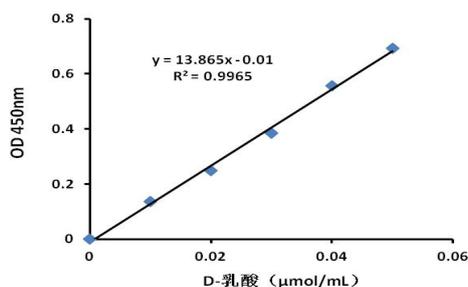
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。
- ② 临用前试剂一、二、三、四可按照比例 20:10:130:10 混成混合液 (用多少配多少量), 下步加样表中直接加 170 $\mu\text{L}$  混合液。
- ③ 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或在水浴锅 (25°C) 中孵育 10min, 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (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°C 条件下避光反应 30min， 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 $\Delta A$  值较小，可增加样本上样量 V1（如增至 40μL，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 $\Delta A$  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 V1（如减至 10μL，则试剂三相应增加），则改变后 V1 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 13.865x - 0.01$ ；x 为标准品摩尔浓度 (μmol/mL)，y 为 $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.01) \div 13.865 \times V2] \div (W \times V1 \div V) = 0.72 \times (\Delta A + 0.01) \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.01) \div 13.865 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) = 0.72 \times (\Delta A + 0.01) \div 500$$

4、按照液体体积计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.01) \div 13.865 \times V2] \div V1 = 0.72 \times (\Delta A + 0.01)$$

5、按照血清体积计算：

$$D\text{-乳酸含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.01) \div 13.865 \times V2] \div V1 = 0.72 \times (\Delta A + 0.01)$$

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 制备标准品母液 (30μmol/mL)：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。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. μmol/mL。
- 3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。