

D-乳酸 (D-Lac) 测试盒说明书

(货号: A019-3-1 比色法 50管/48样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

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 (为使该反应顺利进行另添加酶进一步分解丙酮酸),生成的 NADH 与特异显色剂反应产生有色物质,该有色物质在 450nm 处有最大吸收峰,通过检测该有色物质的生成量,可计算出 D-Lac 含量。

二、试剂组成与配制:(试剂盒有效期 6 个月)

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|--|------|
| 试剂一 | 液体 3.5mL×1 支 | 4℃ |
| 试剂二 | 液体 1.8mL×1 支 | 4℃避光 |
| 试剂三 | 液体 45mL×1 瓶 | 4℃ |
| 试剂四 | 液体 1.8mL×1 支 | 4℃ |
| 标准品 | 标准母液 1mL×1 支 | 4℃ |
| | 取标准母液 (0.6μmol/mL), 用蒸馏水 1:1 (2 倍) 稀释, 配成 0.3μmol/mL 的标准应用液, 现配现用。 | |

三、所需仪器及试剂:

可调 450nm 波长的分光光度计及 1ml 容量比色皿(或酶标仪及 96 孔板), 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅或恒温箱, 蒸馏水, 蛋白测定试剂(组织或细胞用, 本公司有售)。

四、操作步骤:(正式实验前请选取 2 例样本进行预试, 摸索最佳样本浓度, 并了解实验流程)

1、样本前处理:

- 血清(浆)样本:** 可直接使用(样本尽量澄清);
- 组织样本:** 称重(约 0.05-0.1g), 按重量(g) 体积(mL) 比为 1:10 (含量低时可按 1:5 制备) 的比例加入生理盐水, 4℃ 研磨匀浆, 8000-12000 转/分离心 10 分钟, 取上清待测(上清需测定其蛋白浓度);
- 细菌/细胞样本:** 收集细菌或细胞到离心管中(注意去除培养液), 每 500 万细菌或细胞可加入 0.5mL 生理盐水, 超声破碎(冰浴, 功率 20% 或 200W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 重复 5-10 次), 8000-12000 转/分离心 10 分钟, 取上清待测(上清需测定其蛋白浓度);
- 其它液体样本:** a、近似中性的液体样本可直接 8000-12000 转/分离心 10 分钟, 取上清待测; b、酸性液体样本需先用 KOH(5mol/L) 调溶液 pH 值至 8 左右(注意计算最终体积与初始体积的比, 即样本被稀释的倍数), 充分混匀, 室温静置 30 分钟后 8000-12000 转/分离心 10 分钟, 取上清待测。

2、操作表:(试剂一、二、三可预先按所加比例混合配制好后一次性加入反应, 但配好后需尽快使用。所有试剂取出恢复至室温再用)

| | 空白管 | 测定管 | 标准管 |
|---------------------|-----|-----|-----|
| 蒸馏水 (μL) | 90 | | |
| 样本 (μL) | - | 90 | - |
| 0.3μmol/mL 标准液 (μL) | - | - | 90 |
| 试剂一 (μL) | 60 | 60 | 60 |
| 试剂二 (μL) | 30 | 30 | 30 |
| 试剂三 (μL) | 840 | 840 | 840 |
| 试剂四 (μL) | 30 | 30 | 30 |

涡旋混匀, 37℃ 避光反应 30 分钟, 波长 450nm, 分光光度计测定各管吸光值 A (或是每管吸出 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 450nm 处读数),

$$\Delta A_{\text{测定(标准)}} = A_{\text{测定(A 标准)}} - A_{\text{空白}}$$

【注】 1、若样本有很强的背景值(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(即试剂四用蒸馏水代替, 其它试剂保持不变, 则 $\Delta A = A_{\text{测定}}$

-A 对照, 且试剂盒能测的样本数也会减少)。

- 若测定管 ΔA 值较小(如小于 0.01), 则可增加样本上样量(如 180μL, 则空白管蒸馏水量和标准管标准品加入量也需同时增加, 且标准品需先根据加入量的比例进行一定的稀释(如样本量增加到 180μL, 则空白管蒸馏水也加 180μL, 标准品再用蒸馏水稀释成 0.15μmol/mL 后, 也加入 180μL, 则计算时标准品浓度为 0.15μmol/mL), 其它试剂量则不变); 若测定管 ΔA 值较大(如大于 0.8), 则需将样本稀释后测定(稀释倍数代入计算公式计算)。

五、计算:

1、液体样本计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

2、组织样本按样本质量计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} (\mu\text{mol/g 组织}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{W}{V}$$

3、组织(或细胞、细菌)样本按蛋白浓度计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} (\mu\text{mol / 蛋白}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

4、细菌/细胞按数量计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ 个细胞}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{\text{细胞数}}{V}$$

以上公式中,

C_{标准}: 标准品浓度, 0.3μmol/mL;

V 为样本提取时加入的生理盐水的总体积, mL;

N 为样本测试前稀释倍数, 未稀释为 1;

W 为组织样本质量, g;

C_{pr} 为匀浆液蛋白浓度, mg/mL;

细胞数 为细菌/细胞前处理时的数量, 10⁴ 个。

六、注意事项:

- 样本置于冰箱-20℃ 冷冻, 可保存 1 个月左右; -70℃ 冷冻可保存 2~3 个月。温度越低保存时间越长。解冻后的样本或组织匀浆必须当天测定。
- 严重溶血及黄疸会使得测定结果偏高。
- 若用酶标仪读数, 注意吸到孔板中时不要加入气泡, 以免影响结果。
- 若是需要制作标准曲线, 可将标准品配制成 0、0.06、0.12、0.18、0.24、0.3μmol/mL 几个浓度(此标曲各个浓度可根据需要调整, 上限 0.5μmol/mL) 按标准管操作, 所得吸光值统一减去 0 浓度管吸光值后(即为 ΔA) 对应标准品浓度作标准曲线, 再将测定管 ΔA 代入标曲计算, 得到的值

代替上述公式中的 $\frac{\Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}}$ 继续运算, 即可得最

终结果。