

# D-乳酸 (D-Lac) 测试盒说明书

(货号: A019-3-2 微板法 96T)

**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<sup>+</sup>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 1.2mL×1 支	4℃
试剂二	液体 0.6mL×1 支	4℃避光
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃
工作液配制: 将试剂一、试剂二、试剂三按 12:6:168 的比例混合,现配现用。		
试剂四	液体 0.6mL×1 支	4℃
标准品	标准母液 0.5mL×1 支 (浓度 0.6μmol/mL)	4℃

## 三、所需仪器及试剂:

可调 450nm 波长的酶标仪及 96 孔板(附送一块), 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, 超声波碎(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: (所有试剂取出恢复至室温再用)

	空白孔	测定孔	标准孔
蒸馏水 (μL)	18		
样本 (μL)	-	18	-
不同浓度标准品 (μL)	-	-	18
试剂四 (μL)	6	6	6
工作液 (μL)	185	185	185
轻轻振荡孔板混匀, 37℃避光反应 30 分钟, 酶标仪 450nm 处读取各孔吸光值 A, $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ 。			

**【注】1、标准孔用于制作标准曲线用, 标准品稀释为: 将标准母液 (0.6μmol/mL) 用蒸馏水分别稀释至 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) 按操作表标准孔操作, 所得吸光值统一减去 0 浓度管吸光值后 (即为  $\Delta A$ ) 对应标准品浓度作标准曲线。**

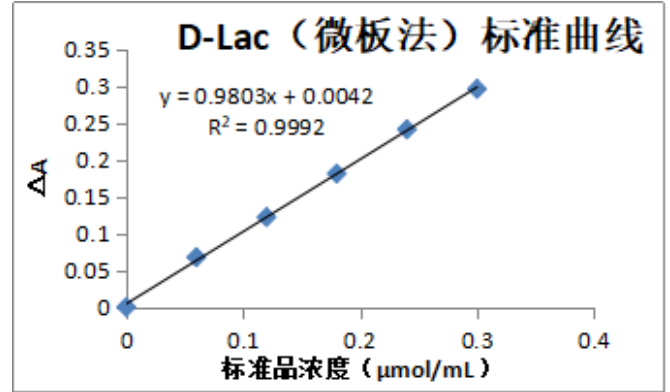
**2、若样本有很强的背景值 (如颜色很深或含有还原性物质如抗坏血酸等), 可以加设一个样本自身对照 (即试剂四用蒸馏水代替, 其它试剂保持不变, 则  $\Delta A = A$**

**测定-A 对照, 且试剂盒能测的样本数也会减少)。**

**3、若测定孔  $\Delta A$  值较小 (如小于 0.01), 则可增加样本上样量 (如 36μL), 则标准曲线的各浓度标准品量也同样增加 (但标曲上限浓度相应降低); 若测定孔  $\Delta A$  值较大 (如大于 0.5 或超过标曲最高点), 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、制作标准曲线为:  $y = 0.9803x + 0.0042$  (仅作参考), 其中, y 表示  $\Delta A$ , x 表示标准浓度 (μmol/mL), 如下图:**



### 2、液体样本计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) = \frac{\Delta A_{测定} - 0.0042}{0.9803} \times N$$

### 3、组织样本按样本质量计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g 组织}} \right) = \frac{\Delta A_{测定} - 0.0042}{0.9803} \times N \div \frac{W}{V}$$

### 4、组织 (或细胞、细菌) 样本按蛋白计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg 蛋白}} \right) = \frac{\Delta A_{测定} - 0.0042}{0.9803} \times N \div C_{pr}$$

### 5、细菌/细胞按细胞数量计算公式:

$$D\text{-乳酸含量} \left( \frac{\mu\text{mol}}{10^4 \text{ 个细胞}} \right) = \frac{\Delta A_{测定} - 0.0042}{0.9803} \times N \div \frac{\text{细胞数}}{V}$$

以上公式中,

**V** 为样本前处理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<sub>pr</sub>** 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, 10<sup>4</sup> 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。
- 酶标仪读数时, 注意孔板中时不要有气泡, 以免影响结果。
- 工作液配制好后, 尽量也要避光并尽快使用。
- 一批实验, 如无多孔加样枪 (排枪), 则尽量不要做太多孔, 以免操作时间过长影响样本间数值。