

## D-乳酸含量检测试剂盒说明书

(货号: PB1180F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

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!

### 测定意义:

乳酸是生物体代谢过程中重要的中间产物, 与糖代谢、脂类代谢、蛋白质代谢及细胞内能量代谢密切相关, 乳酸含量是评估糖元代谢的和有氧代谢的重要指标。

### 测定原理:

以  $\text{NAD}^+$  为氢受体, D-乳酸脱氢酶 催化 D-乳酸脱氢产生丙酮酸, 使  $\text{NAD}^+$  转化成  $\text{NADH}$ 。其中 PMS 递氢使 NBT 还原为紫色呈色物, 呈色物的吸光度在 540nm 时与乳酸含量成线性关系。

### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、离心机、可调式移液器、微量石英比色皿、研钵和蒸馏水、盐酸

### 试剂的组成和配制:

提取液: 液体 50ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 10ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 2ml×1 瓶, 4℃ 避光保存;

试剂三: 液体 1ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂四: 液体 0.7ml×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂五: 0.1mol/L 盐酸溶液 (60ml); 自备;

标准品: 液体 1ml×1 瓶, 30mmol/L D-乳酸标准品溶液, 4℃ 保存;

### 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℃, 12000rpm 离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按细菌/细胞数量 (10<sup>4</sup> 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。

### 测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

2、工作液的配置: 试剂一: 试剂二: 试剂三=10:2:1 的比列配置, 根据样本量配置, 临用新制。

3、D-乳酸标准曲线的制备：取 30mmol/L 的 D-乳酸标准液用蒸馏水稀释成不同浓度：1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L，进行标准曲线的制备。

| 浓度      | D-乳酸标准液 (μl) | 蒸馏水 (μl) |
|---------|--------------|----------|
| 1mmol/L | 10           | 290      |
| 2mmol/L | 20           | 280      |
| 3mmol/L | 30           | 270      |
| 4mmol/L | 40           | 260      |
| 5mmol/L | 50           | 250      |

4、加样表：在 EP 管中依次加入

| 试剂 (μL)     | 空白管  | 标准管  | 测定管  |
|-------------|------|------|------|
| 样本          |      |      | 20   |
| 标准品         |      | 20   |      |
| 蒸馏水         | 20   |      |      |
| 工作液         | 200  | 200  | 200  |
| 试剂四         | 10   | 10   | 10   |
| 37℃反应 10min |      |      |      |
| 试剂五         | 1000 | 1000 | 1000 |

取 1ml 至石英比色皿中，于 540nm 处波长处读取吸光度，分别记为 A 测定管，A 标准管，A 空白管，计算  $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ ； $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

### 乳酸含量计算：

1、标准曲线的绘制 以各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值 ( $\Delta A_{标准}$ ) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A_{测定}$  带入公式中得到 x (mmol/L)。

### 2、D-乳酸含量计算

(1) 按照样本蛋白浓度计算

$$D\text{-乳酸含量 (mmol/mg prot)} = x \div C_{pr} \times 10^{-3} = x \div C_{pr} \times 10^{-3}$$

(2) 按照样本质量计算

$$D\text{-乳酸含量 (mmol/g 鲜重)} = x \times V_{样总} \div W \times 10^{-3}$$

(3) 按照细胞数量计算

$$D\text{-乳酸含量 (mmol/10}^4\text{cell)} = x \times V_{样总} \div 500 \times 10^{-3}$$

(4) 按照液体体积计算

$$D\text{-乳酸含量 (mmol/L)} = x$$

W: 样本质量, g;  $C_{pr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定;  $V_{样总}$ : 加入的提取液体积, 1mL; 500: 细胞数量, 500 万;  $10^{-3}$ : 1mmol/L=10<sup>-3</sup>mmol/ml。