



D-乳酸含量检测试剂盒说明书

(货号: PB1180W96 微量法 96 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 NAD^+ 为氢受体, D-乳酸脱氢酶 催化 D-乳酸脱氢产生丙酮酸, 使 NAD^+ 转化成 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/酶标仪、水浴锅、离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵和蒸馏水、盐酸

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 20ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 4ml×1 瓶, 4℃ 避光保存;

试剂三: 液体 2ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂四: 液体 1.2ml×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂五: 0.1mol/L 盐酸溶液 (110ml); 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 (10⁴ 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 200 μl 至微量石英比色皿/96 孔板中，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 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管； ΔA 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 (ΔA 标准) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 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

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

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细胞数量计算

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

(4) 按照液体体积计算

$$\text{D-乳酸含量 (mmol/L)} = x$$

W: 样本质量, g; Cpr: 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^{-3} mmol/ml。