

D-Lactic Acid Content Assay Kit

D-乳酸含量 (D-LA) 试剂盒说明书

货号:BN72048| 方法: 可见分光法 | 规格: 48 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 NAD^+ 还原生成 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 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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C 保存	使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 支	4°C 保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C 保存	
试剂五	液体 μL ×2 支	-20°C 保存	使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 μL ×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
② 临用前试剂一、二、三、四可按照比例 40:20:540:20 混成混合液 (用多少配多少量),

下步加样表中直接加 620μL 混合液。

- ③ 所有试剂解冻至室温（25℃）或在水浴锅（25℃）中孵育 10min，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

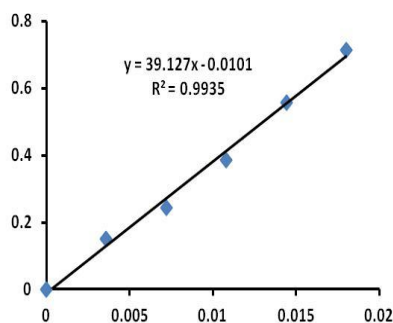
试剂名称（μL）	测定管	空白对照(仅做一个)
样本	60	0
试剂一	40	40
试剂二	20	20
试剂三	540	600
试剂四	20	20
试剂五	20	20
混匀，立即于 37℃条件下避光反应 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定} - A - \text{空白}$ 。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

- 1、标准曲线： $y = 39.127x - 0.0101$ ；x 为标准品摩尔质量（μmol），y 为 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

- 2、按照样本质量计算：

$$D\text{-乳酸}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.43 \times (\Delta A + 0.0101) \div W \times D$$

- 3、按照细菌/细胞计算：

$$D\text{-乳酸}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 0.0009 \times (\Delta A + 0.0101) \times D$$

- 4、按照液体体积计算：

$$D\text{-乳酸}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div V1 \times D = 0.43 \times (\Delta A + 0.0101) \times D$$

- 5、按照血清体积计算：

$$D\text{-乳酸}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.0101) \div 39.127] \div V1 \times D = 0.43 \times (\Delta A + 0.0101) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.06mL；

W---样本质量，g；

D-乳酸分子量 Mr---90.08；

500---细胞数目，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。