

D-乳酸含量

规格：微量法 48 样

检测波长：340nm

编号：DLA-W48-N(1620)

注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

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：

D-乳酸在 D-乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸盐，同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ ，NADH 与 D-乳酸的量存在化学计量关系，通过测定 340nm 下 NADH 的吸光值即可测得 D-乳酸含量。

自备仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、恒温箱、震荡仪、冰、蒸馏水

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 60mL	x1	4°C	
试剂一	粉剂	x1	-20°C,避光	
试剂二	粉剂	x1	-20°C,避光	
试剂三	粉剂	x1	-20°C,避光	
标准品母液	液体 1mL	x1	4°C, 避光	10umol/mL D-乳酸

样本处理（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

- 1、按照质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例加入提取液，冰浴匀浆；
(样本取样量记为 W，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 0.1g：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 12,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清测定。

二、细菌/细胞样本

- 1、按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例加入提取液，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；
(样本取样量记为 N (万个)，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 500 万：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 12,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清测定。

三、液体样本

澄清样本可直接检测，若浑浊则离心取上清检测；

实验准备：

- 1、试剂一的制备：瓶中加入 2.2mL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20℃ 保存；不可反复冻融，建议根据每次使用量分装保存)
 - 2、试剂二的制备：瓶中加入 2.4mL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20℃ 保存；不可反复冻融，建议根据每次使用量分装保存)
 - 3、试剂三的制备：瓶中加入 125uL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20℃ 保存；不可反复冻融，建议根据每次使用量分装保存)
- (试剂一，二，三均为微量粉剂，开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后小心开盖)
- 4.将标准品母液稀释 10 倍即为 1umol/mL D-乳酸。
 - 5.酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm；

测定操作：

- 1、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	对照管 (选做)	空白管 (*只做一管)	标准管 (*只做一管)
提取液	100	100	100	100
试剂一	20	20	20	20
试剂二	40	-	40	40
样本	60	60	-	-
标准品	-	-	-	60
蒸馏水	-	40	60	-
混匀，5min 后于 340nm 处读取吸光值 A ₁				
试剂三	2	2	2	2
混匀，30min 后于 340nm 处读取吸光值 A ₂ 。 $\Delta A_{\text{样}} = (A_2 - A_1)_{\text{测定}} - (A_2 - A_1)_{\text{空白}}$ 或 $\Delta A_{\text{样}} = (A_2 - A_1)_{\text{测定}} - (A_2 - A_1)_{\text{对照}}$ $\Delta A_{\text{标}} = (A_2 - A_1)_{\text{标准}} - (A_2 - A_1)_{\text{空白}}$				

注意：

- 1、样本含有 NADH、NADPH 等物质时会干扰检测，或样本存在很强的背景值时，需要设立对照管；(若每个样本都做对照管则该试剂盒由原来可测 48 样变为 24 样)
- 2、若 $\Delta A_{\text{样}} > 0.5$ 则超出试剂盒线性范围，建议将样本用提取液稀释后测定，稀释倍数(D)代入公式计算；
- 3、若 $\Delta A_{\text{样}} < 0.02$ ，建议尝试增加样本取样量(W 或 N)测定，或减少提取液用量以提高样本浓度；或者可以适当增加样本加样体积($V_{\text{样}}$)，改变的数据代入公式重新计算。

结果计算：

(1) 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div \text{Cpr} \times D \\ &= 1 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{g}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (W \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 1 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \times D\end{aligned}$$

(3) 按照细菌/细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (N \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 1 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div N \times D\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \times D \\ &= 1 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \times D\end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.01mL；

W ：样本质量，g；

D ：额外稀释倍数，未稀释即为1；

N ：细菌/细胞数量，万个；

$V_{\text{提}}$ ：加入提取液体积，1mL；

Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL；

$V_{\text{标}}$ ：加入反应体系中标准品体积，0.01mL；

C ：标准品浓度，1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。