

D-乳酸含量测定试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHB1-C24	D-乳酸含量测定试剂盒	24T	常量法
AYHB1-C48		48T	常量法

一、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。

二、测定原理：

D-乳酸在 D-乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸，同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ ，在 PMS 作用下，WST 可以与 NADH 反应，产生水溶性 formazan, 在 450nm 处有特征吸收峰。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2~8℃ 保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2~8℃ 保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	液体 12 mL×1 瓶	2~8℃ 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2~8℃ 保存
制备液：将试剂二倒入试剂三中超声使其完全溶解，使用前放置于 37℃ 保温 10 分钟。			
试剂四	液体 0.6 mL×1 瓶	液体 0.6mL×2 瓶	-20℃ 保存
试剂五	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2~8℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 瓶	液体 1 mL×1 瓶	2~8℃ 保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌/细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃ 离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零；
- 2、临用前将试剂一与制备液按照5：1的比例混合好，配制成工作液；
- 3、临用前将50mmol/L标准品用蒸馏水稀释成5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125mmol/L的标准液备用。

4、操作表

试剂名称	测定管	标准管	空白管	对照管
待测样本（μL）	50	-	-	50
标准品（μL）	-	50	-	-
蒸馏水（μL）	-	-	50	-
工作液（μL）	500	500	500	500
试剂四（μL）	100	100	100	100
混匀，37℃水浴保温 10min				
试剂五（μL）	350	350	350	350
混匀后蒸馏水调零，立即在波长 450nm 处读取各管吸光度值，分别记为 A 测定管，A 对照管，A 标准管，A 空白管，计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定管}-A_{对照管}$ ； $\Delta A_{标准}=A_{标准管}-A_{空白管}$ 。				

五、D-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/mL）。

2、D-乳酸含量计算

（1）按照蛋白含量计算

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

（2）按照样本质量计算

$$D\text{-乳酸含量 (mmol/g 质量)} =$$

（3）按照细胞数量计算

$$D\text{-乳酸 A 含量 (mmol/10}^6 \text{ cell)} =$$

（4）按照液体体积计算

$$D\text{-乳酸含量 (mmol/mL)} =$$

V 样本：加入的样本体积，0.02mL；

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 提取液一：加入的提取液一体积，1mL；

N: 细胞数量，以百万计；

V 液体：液体样本体积，0.1mL。

六、注意事项：

1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

2、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。