

ARBEIDSBESKRIVELSE
Institutt for husdyr – og akvakulturvitenskap, UMB

Metodenavn: **D-L-laktat i blod og vomsaft**

IHA-nr.: ARB-1161

1. Innledning

L-laktat er ofte sluttproduktet i metabolismen(stoffskiftet) til alle levende organismer. D-laktat blir dannet av mikro-organismer, og påvisning av D-laktat indikerer en mikrobeaktivitet.

2. Utstyr

Sentrifugerør
Finnpipette m/spisser
Pasteurpipette
Wortexmixer
TT-rør
Engangskyvetter(Plastibrand Cat.no 7590 15 1,5ml halvmikro)forhandler Kebo tlf.2290003
Spektrofotometer, Shimadzu UV-1201

3. Arbeidsbeskrivelse

A. Prøvemateriale

Vomsaft som er konserverert med pH ca 2-2,5 må justeres til pH 8-10 med 5M og 0,5M NaOH eller KOH. Dette gjøres på følgende måte:
Pipetter 2,5ml (med pH ca 2,5 v/romtemperatur) vomsaft i et sentrifugerør. Tilsett 5 dråper Kresolphthalin (0,02 % i etanol, pH 8,2-9,8). Ca 0,55ml 5M NaOH eller KOH tilsettes først, videre tilsettes 0,5M NaOH/KOH dråpevis til fargeomslag (rødt). Fyll op til 5ml-merket på røret med dobbeltdestillert vann. Fortynningen er da 1:1. Vanligvis trenger man ikke fortynne noe utover dette. Man bør ha 3-5ml vomsaft.
Blod tas på vacuteiner tilsatt heparin, og sentrifugeres i 10min v/3000rpm og pipeteres av. Prøvene kan fryses i -20 °C fram til analysering.

B. Reagenser

Til analysen av D-L-laktat kjøpes kit (ca 25 tester) fra Boehringer Mannheim Cat.no. 1112821. Kitet bestilles fra Food Diagnostik A.S.

Kitet består av

1. Buffer 30ml, glycyglycine buffer pH=10.0, L-glutamic acid, 440mg stabilisert
2. NAD, 210mg, lypohilisate
3. Glutamate-pyruvate transaminase 0,7ml ca 1100U
4. D-laktat dehydrogenase 0,7ml ca 3800U
5. L-laktat dehydrogenase 0,7ml ca 3800U
6. D-laktat standard løsning (brukes uforynnet)

| IHA/UMB | | | | | ARB | |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|----------|-----------|--|----------|
| Utarbeidet av Inger Joh. Jørgensen | Godkjent Anna Haug | Gjelder fra 2001-05-09 | Revisjon | Erstatter | Dokumentnavn: Arb.D-L-laktat i blod og vomsaft.DOC | Side 1-3 |

7. L-laktat standard løsning (brukes ufortynnet)

Preparering av reagenser

Bruk løsning 1,3,4,og 5 ufortynnet

Tilsett 6ml dobbeltdestillert vann til flaske 2

Stabilitet av reagensene

Innholdet i flaske 1,3,4 og 5 er stabile til holdbarhetsdato ved +4 °C

Buffer (1) bør ha temperatur 20-25° C før bruk.

Innholdet i flaske 2 er stabilt til holdbarhetsdato når det ikke er oppløst. Når det er løst kan det lagres ved +4 °C i 3 uker eller 2mnd.ved -20 °C.

4. Utførelse

Det finnes også en metode med spektrofotometisk avlesning på Cobas Mira S.

Shimadzu spektrofotometer står på ernæringslabben i 1 etg. Start apparatet etter manual som

Ligger ved siden av. La det varmes opp ca. 10-15 min før bruk.

Bølgelengde: 340nm

Cuvette: 1cm

Temperatur: 20-25° C

Sluttvolum: 2,240ml D-laktat

2,260ml L-laktat

Sett opp etter følgende skjema:

| Pipetter i TT-rør | Blank | Standard D-laktat | Standard L-laktat | Prøve 1 | Prøve 2 osv... |
|-------------------|--------|-------------------|-------------------|---------|----------------|
| Løsning 1 | 1,0ml | 1,0ml | 1,0ml | 1,0ml | 1,0ml |
| Løsning 2 | 0,2ml | 0,2ml | 0,2ml | 0,2ml | 0,2ml |
| Suspensjon 3 | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml |
| Prøve | ----- | ----- | ----- | 0,1ml | 0,1ml |
| St. D-laktat | ----- | 0,1 | ----- | ----- | ----- |
| St. L-laktat | ----- | ----- | 0,1ml | ----- | ----- |
| Dobb.dest.vann | 1,0ml | 0,9ml | 0,9ml | 0,9ml | 0,9ml |

Mix og les av absorbansen etter ca 5min.(A₁) på blank, standarer og prøvene. Start reaksjonen ved å tilsette løsning 4.

| | | | | | |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Løsning 4 | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|

Mix og les av absorbansen etter ca 30min (A₂) på blank, standarer og prøver. Tilsett løsning 5.

| | | | | | |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Løsning 5 | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml | 0,02ml |
| | | | | | |

| IHA/UMB | | | | | | ARB |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|----------|-----------|--|----------|
| Utarbeidet av Inger Joh. Jørgensen | Godkjent Anna Haug | Gjelder fra 2001-05-09 | Revisjon | Erstatter | Dokumentnavn: Arb.D-L-laktat i blod og vomsaft.DOC | Side 2-3 |

Mix og les av absorbansen etter ca 30min. (A_3) på blank,standarer og prøver. Finn absorbanse-differansen(A_2-A_1) for blank, standarer og prøver. Trekk fra abs.diff. av blank fra abs.diff.av standarer og prøver.Det er $A_{D-LAKTAT}$
 Finn abs.diff. (A_3-A_2) for blank, standarer og prøver. Trekk fra abs.diff. av blank fra abs.diff. av standarer og prøver.Det er $A_{L-laktat}$
 Utregning

$$C = \frac{V \cdot M}{D \cdot v \cdot 1000 \cdot A(g/l)}$$

V= sluttvolum

v prøvevolum

M_v =molekylvekt = 90,1 både for D og L-laktat

D = lyslengde =1cm

= extinction koeffisient NADH ved 340 nm =6,3

dvs. Konsentrasjonen for D-laktat:

$$C = \frac{2,24 \cdot 90,1}{6,3 \cdot 1,0 \cdot 0,1 \cdot 1000} \cdot A \text{ g/l}$$

og for L-laktat

$$C = \frac{2,26 \cdot 90,1}{6,3 \cdot 1,0 \cdot 0,1 \cdot 1000} \cdot A \text{ g/l}$$

| | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|----------|-----------|---|----------|
| IHA/UMB | | | | | | ARB |
| Utarbeidet av Inger Joh. Jørgensen | Godkjent Anna Haug | Gjelder fra 2001-05-09 | Revisjon | Erstatter | Dokumentnavn: Arb.D-L-laktat i blod og vomsaft.DOC | Side 3-3 |