

L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒说明书

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D100327

规格：50 T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

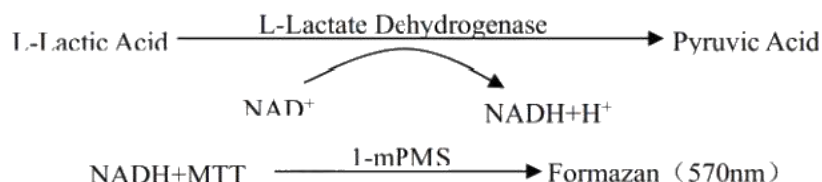
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体60mL×1瓶	2-8℃保存
提取液二	液体10mL×1瓶	2-8℃保存
试剂一	液体10mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	液体45 μL×1瓶	2-8℃保存
试剂三	液体12mL×1瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃保存
试剂五	液体40mL×1瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二工作液：临用前先将试剂二液体甩离至管底部(使用掌上离心机即可)；按试剂一：试剂二=450 μL:2μL (共452 μL, 约 3T) 的比例稀释，现用现配；
- 2、试剂三：试剂三为黄色溶液，需要严格避光。
- 3、试剂四：临用前加入4mL 蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存4周，避免反复冻融；
- 4、试剂四工作液：按试剂三：试剂四=540 μL:180μL (共720 μL,3T) 的比例稀释，现用现配，需严格避光；
- 5、标准品：临用前加入1.04mL 蒸馏水配成100 μ mol/mL 的标准品；2-8℃保存4周。
- 6、2μmol/mL 标准品的配制：临用前将20 μL 100μmol/mL 的 L- 乳酸标准品和980 μL 蒸馏水混合稀释为2μmol/mL 的标准品待测。

产品说明：

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，乳酸含量是评估糖原代谢的和有氧代谢的重要指标。乳酸在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⁺，H⁺ 传递给PMS生成的PMSH₂还原MTT生成紫色物质，在570nm处有特征吸收峰。



技术指标：

最低检出限：0.03 μ mol/mL

线性范围：0.03125-3 μ mol/mL

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

天平、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、离心机、可调式移液枪、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、恒温水浴锅/恒温培养箱、蒸馏水、生理盐水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

1. 组织：按照质量 (g)：提取液一体积(mL)为1:5~10的比例(建议称取约0.1g，加入1mL提取液一)加入提取液一，冰浴匀浆后12000g 常温离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，常温12000g 常温离心10min后取上清待测。
2. 血清(浆)等液体：取100 μL液体加入1mL提取液一，12000g 常温离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，12000g 常温离心10min后取上清待测。
3. 细胞：按照细胞数量(10⁶个)：生理盐水体积(mL) 为5~10:1的比例(建议5×10⁶个细胞加入1mL生理盐水)，冰浴超声波破碎细胞(功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min);12000g 常温离心10min后取上清待测。

注：(1)提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。

(2)若样本内蛋白含量微量并且颜色很浅，也可直接用生理盐水匀浆、离心、检测。

(3)细菌样本可适当延长超声时间。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，波长调至570nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂二工作液、试剂四工作液可37℃孵育5min。
- 3、加样表：(在1.5mL EP管中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	30	-	-
标准品		30	-
蒸馏水	-	-	30
试剂二工作液	150	150	150
试剂四工作液	240	240	240
37℃严格避光反应10min			
试剂五	600	600	600

充分混匀后，于570nm处测定吸光值，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。(标准管和空白管只需做1-2次)。

三、乳酸含量的计算

1. 按照蛋白含量计算

$$L-LA \text{ 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \times F$$

$$= 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

2. 按照样本质量计算

$$L-LA \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F$$

$$= 2.375 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{L-LA 含量} (\mu\text{mol}/10^6\text{cell}) = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \times V \text{细胞提取} \div N \times F = 2 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{L-LA 含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \times (V \text{上清} + V \text{提取液二}) \div [V \text{液体} \times V \text{上清} \div (V \text{提取液一} + V \text{液体})] \times F \\ = 26.125 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \times F$$

C标准: 标准品浓度, $2 \mu\text{mol}/\text{mL}$; V 样本: 加入的样本体积, 0.03mL ; 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 上清: 提取时上清液体积, 0.8mL ; V 提取液二: 加入的提取液二体积, 0.15mL ; V 提取液一: 加入的提取液一体积, 1mL ; V 细胞提取: 细胞提取液, 1mL ; N: 细胞数量, 以百万计; V 液体: 液体样本体积, 0.1mL ; F: 稀释倍数。

注意事项:

1. 如果A测定管 >1.5 或 ΔA 测定 >1 , 可以用蒸馏水稀释样本后再进行测定, 如果 ΔA 测定 <0.02 , 可以适当增加样本量进行测定, 注意同步修改计算公式。
2. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取样本。

实验实例:

- 1、取 0.106g 大鼠心加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨离心, 取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二, 离心取上清后用蒸馏水稀释2倍, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管= $0.757-0.080=0.677$, ΔA 标准=A标准管-A 空白管= $0.846-0.080=0.766$, 按样本质量计算含量得:

$$\text{L-LA 含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 2.375 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \div W \times F = 39.60 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$$

- 2、取 $100 \mu\text{L}$ 大鼠血清加入 1mL 提取液一, 取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二, 离心取上清, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管= $0.512-0.080=0.432$, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管= $0.846-0.080=0.766$, 按照液体体积计算含量得:

$$\text{L-LA 含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = 26.125 \times \Delta A \text{测定} \div \Delta A \text{标准} \times F = 14.73 \mu\text{mol}/\text{mL}。$$

参考文献:

[1]Jin Bingjun,Li Taiyuan,Zhang Chunfeng.Determination of lactic acid concentration in bovine blood by enzymatic method [J].Chinese Journal of Veterinary Medicine,1990,16(07):23-25.

[2]Eolbergrová J,MacMillan V,Siesjö B K.The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/NAD ratio of the rat brain[J].Journal of neurochemistry,1972,19(11):2497-2505.