

# L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒

中文名称：L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒

英文名称：Lactic Acid(LA) Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

**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：**乳酸在乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸，同时使 NAD<sup>+</sup>还原生成 NADH 和 H<sup>+</sup>，H<sup>+</sup>传递给 PMS 生成的 PMSH<sub>2</sub> 还原 MTT 生成紫色物质，在 570nm 处有特征吸收峰。

**产品组成：**

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂五	液体 2mL×1 瓶	2-8°C保存

标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存
-----	--------	--------

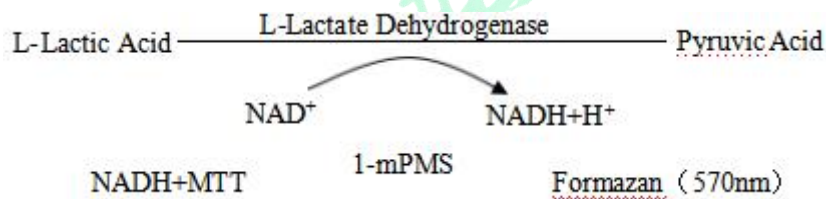
**溶液的配制:**

1, 试剂二: 临用前按试剂二 (V): 蒸馏水 (V) = 10 $\mu$ L: 450 $\mu$ L 的比例配制试剂二溶液, 现用现配;

2, 试剂四: 临用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水混匀, 可分装后-20℃保存, 避免反复冻融, -20℃保存 4 周,

3, 标准品: 临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 $\mu$ mol/mL 的标准溶液; 2-8℃保存 4 周。

**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, 乳酸含量是评估糖元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<sup>+</sup>还原生成 NADH 和 H<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>传递给 PMS 生成的 PMSH<sub>2</sub> 还原 MTT 生成紫色物质, 在 570nm 处有特征吸收峰。

**技术指标:**

低检出限: 0.0771 $\mu$ mol/mL

线性范围: 0.078-5 $\mu$ 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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品:**

天平、研钵/匀浆器、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、乙醇和蒸馏水。

**操作步骤:**

## 一、样本处理(可适当调整待测样本量)

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, 冰浴匀浆后于 4℃, 12000g 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, 4℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞: 按照细胞数量 ( $10^6$ 个): 提取液一体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例 (建议  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1mL 提取液一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 于 4℃, 12000g 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, 4℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。

3. 血清 (浆) 等液体: 取 100 $\mu$ L 液体加入 1mL 提取液一, 4℃ 12000g 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 离心 10min 后取上清待测。

**注: 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。**

## 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上, 波长调至 570nm, 分光光度计用乙醇调零。

2、标准液的稀释: 将 100 $\mu$ mol/mL 的标准溶液用蒸馏水稀释为 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 $\mu$ mol/mL 的标准溶液待测。

### 3、标准品稀释表:

序号	稀释前浓度( $\mu$ mol/mL)	标准溶液体积( $\mu$ L)	蒸馏水体积( $\mu$ L)	稀释后浓度( $\mu$ mol/mL)
1	100	50	450	10
2	10	100	300	2.5
3	2.5	200	200	1.25
4	1.25	200	200	0.625

5	0.625	200	200	0.3125
6	0.3125	200	200	0.15625
7	0.15625	200	200	0.078

实验中每个标准管需 10 $\mu$ 标准溶液。

#### 4、加样表：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本( $\mu$ L)	10	10	-	-
标准品( $\mu$ L)	-	-	10	-
蒸馏水( $\mu$ L)	-	10	-	10
试剂一( $\mu$ L)	40	40	40	40
试剂二( $\mu$ L)	10	-	10	10
试剂四( $\mu$ L)	20	20	20	20
在 EP 管中充分混匀，于 37 $^{\circ}$ C 水浴准确反应 20min。				
试剂五( $\mu$ L)	6	6	6	6
试剂三( $\mu$ L)	60	60	60	60
37 $^{\circ}$ C 避光反应 20min 后于 25 $^{\circ}$ C，10000rpm 离心 10min，去上清，留沉淀。				
乙醇( $\mu$ L)	200	200	200	200
充分溶解沉淀后，于 570nm 处测定吸光值，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。(标管和空白管只需做 1-2 次)				

### 三、乳酸含量的计算

#### 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  $x(\mu\text{mol/mL})$ 。

#### 2、乳酸含量计算

##### (1) 按照蛋白含量计算

$$L\text{-LA 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

**(2) 按照样本质量计算**

$$\text{L-LA 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.1875 \times x \div W$$

**(3) 按照细胞数量计算**

$$\text{L-LA 含量}(\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \div N = 1.1875 \times x \div N$$

**(4) 按照液体体积计算**

$$\text{L-LA 含量}(\mu\text{mol/mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] = 13.0625 \times x$$

V 样本：加入的样本体积，0.05mL；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；N：细胞数量,以百万计；V 液体：液体样本体积，0.1mL。

**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. 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 0.1g 兔心加入 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，离心取上清后稀释 5 倍，之后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A 测定管 - A 对照管 = 0.591 - 0.069 = 0.522，根据标准曲线  $y = 0.412x - 0.0214$ ， $x = 1.319$ ，按样本质量计算含量得：

L-LA 含量( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $1.1875 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 1.1875 \times 1.319 \div 0.1 \times 5 = 78.32 \mu\text{mol/g}$  质量。

2、取  $100\mu\text{L}$  小鼠血清加入  $1\text{mL}$  提取液一，取  $0.8\text{mL}$  上清后加  $0.15\text{mL}$  提取液二，离心取上清，之后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A 测定管 - A 对照管 =  $0.572 - 0.211 = 0.361$ ，根据标准曲线  $y = 0.412x - 0.0214$ ,  $x = 0.928$ ，按照液体体积计算含量得：

L-LA 含量( $\mu\text{mol/mL}$ ) =  $13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.928 = 12.122 \mu\text{mol/mL}$ 。

mlbio 酶联生物  
Good elisakit producers