

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：50T/24S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 24mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

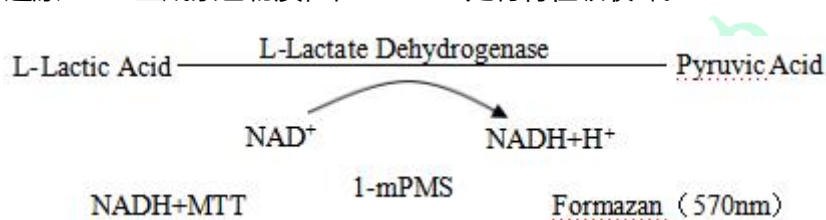
溶液的配制：

1、试剂二：临用前按试剂二(V)：蒸馏水(V)=10μL：450μL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 8 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 100μmol/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⁺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:

低检出限: 0.0387 μmol/mL

线性范围: 0.039- 1 μmol/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、1mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅或者恒温培养箱、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 5×10^6 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°C , 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°C 12000g 离心 10min 后取上清待测。

3. 血清 (浆) 等液体: 取 $100\mu\text{L}$ 液体加入 1mL 提取液一, 4°C 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, 乙醇调零。

2、标准液的稀释: 将 $100\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标准溶液用蒸馏水稀释为 1、0.625、0.3125、0.15625、0.078、 $0.039\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标准溶液待测。

3、标准品稀释表:

序号	稀释前浓度($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	标准溶液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度($\mu\text{mol}/\text{mL}$)
1	100	50	450	10
2	10	50	450	1
3	10	50	750	0.625
4	0.625	200	200	0.3125
5	0.3125	200	200	0.15625
6	0.15625	200	200	0.078
7	0.078	200	200	0.039

实验中每个标准管需 $50\mu\text{L}$ 标准溶液。

4、加样表:

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本(μL)	50	50	-	-
标准品(μL)	-	-	50	-
蒸馏水(μL)	-	50	-	50
试剂一(μL)	200	200	200	200
试剂二(μL)	50	-	50	50
试剂四(μL)	100	100	100	100
混匀，置于 37°C水浴锅/恒温培养箱中培养 1h				
试剂五(μL)	30	30	30	30
试剂三(μL)	300	300	300	300
37°C避光反应 20min 后于 25°C，10000rpm 离心 10min，去上清，留沉淀。				
乙醇(μL)	1000	1000	1000	1000
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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。(标曲和空白管只需做 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

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

(3) 按照细胞数量计算

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

$$=1.1875 \times x \div N$$

(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，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.137 - 0.125 = 1.012$ ，根据标准曲线

$y = 0.7826x + 0.0215$ ，计算 $x = 1.266$ ，按样本质量计算含量得：

$$\text{L-LA 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = 1.1875 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 1.1875 \times 1.266 \div 0.1 \times 5 = 75.17 \mu\text{mol/g 质量}。$$

2、取 100 μ L 小鼠血清加入 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.152 - 0.407 = 0.745$ ，根据标准曲线 $y = 0.7826x + 0.0215$ ， $x = 0.924$ ，按照液体体积计算

含量得:

L-LA 含量($\mu\text{mol/mL}$)= $13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.924 = 12.07 \mu\text{mol/mL}$ 。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers