

L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2235

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

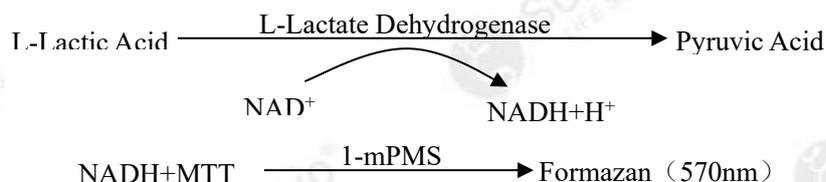
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 25 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂五	液体 24 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

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=450μL：2μL（共 452μL，约 9T）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 2.4 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20°C保存 4 周，避免反复冻融，需严格避光；
- 4、试剂四工作液：按试剂三（V）：试剂四（V）=600μL：200μL（共 800μL，10T）的比例稀释，现用现配；
- 5、标准品：临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 μmol/mL L-乳酸标准品；2-8°C保存 4 周。
- 6、2μmol/mL 标准品的配制：临用前将 20μL 100μmol/mL 的标准品和 980μL 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 μmol/mL

线性范围：0.03125-6 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。

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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、恒温水浴锅、蒸馏水。

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（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. 细胞：按照细胞数量（10⁶个）：提取液一（mL）为5~10：1的比例（建议5×10⁶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）；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. 血清（浆）等液体：取100μL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。

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。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，波长调至570nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、试剂二工作液、试剂四工作液可37°C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	10	-	-
标准品	-	10	-
蒸馏水	-	-	10
试剂二工作液	50	50	50
试剂四工作液	80	80	80
37°C严格避光反应 10min			
试剂五	200	200	200

充分混匀后，取 200μL 反应液于微量比色皿/96 孔板中测定 570nm 处吸光值，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. 按照样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{L-LA 含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ &= 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{L-LA 含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F \\ &= 2.375 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F \end{aligned}$$



3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) &= \text{C标准} \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times (\text{V上清} + \text{V提取液二}) \div (\text{N} \times \text{V上清} \div \text{V提取液一}) \times \text{F} \\ &= 2.375 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \div \text{N} \times \text{F} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

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

C标准：标准品浓度，2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V样本：加入的样本体积，0.01mL；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：加入提取液二的体积，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；F：稀释倍数。

注意事项：

1. 如果A测定管>1.5或 ΔA 测定>1.2，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，离心取上清后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.797-0.096=0.701， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.539-0.096=0.443，按样本质量计算含量得：

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 2.375 \times \Delta\text{A 测定} \div \Delta\text{A 标准} \div \text{W} \times \text{F} = 35.45 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$$

- 2、取 100 μL 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，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.334-0.096=0.238， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.539-0.096=0.443，按照液体体积计算含量得：

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = 26.125 \times \Delta\text{A 测定} \div \Delta\text{A 标准} \times \text{F} = 14.04 \mu\text{mol}/\text{mL}。$$

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.

相关系列产品：

- BC0740/BC0745 己糖激酶（HK）活性检测试剂盒
- BC0540/BC0545 丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒
- BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒
- BC5350/BC5355 D-乳酸（D-LA）含量检测试剂盒（WST显色法）
- BC5280/BC5285 D-乳酸脱氢酶（D-LDH）活性检测试剂盒

