

L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC2230

规格：50T/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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

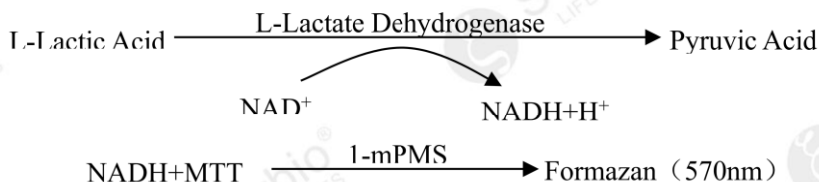
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 45 μL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

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 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 4 mL 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=540μL：180μL（共 720μL，3T）的比例稀释，现用现配，需严格避光；
- 5、标准品：临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 μmol/mL 的标准品；2-8℃保存 4 周。
- 6、2μmol/mL 标准品的配制：临用前将 20μL 100μmol/mL 的 L-乳酸标准品和 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：0.03125-3 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、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（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。
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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ； $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。（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

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

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

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div N \times F = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

4. 按照液体体积计算

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

C标准：标准品浓度，2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V样本：加入的样本体积，0.03mL；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；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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.757 - 0.080 = 0.677$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.846 - 0.080 = 0.766$ ，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 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，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.512 - 0.080 = 0.432$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.846 - 0.080 = 0.766$ ，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.

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

