



L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒(微量法)

中文名称：**L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒(微量法)**

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℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

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℃保存
提取液二	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 2mL×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；

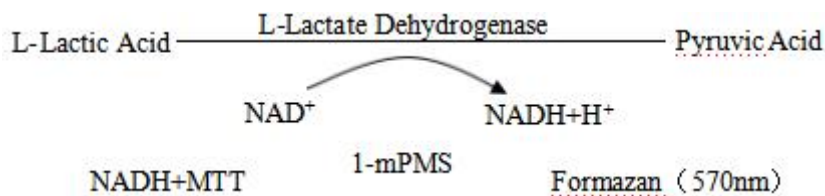
2, 试剂四：临用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存，避免反复冻融， -20℃

保存 4 周,

3, 标准品: 临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 μ mol/mL 的标准溶液; 2-8 $^{\circ}$ C 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: 0.0771 μ mol/mL

线性范围: 0.078-5 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。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

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 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 μL 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，分光光度计用乙醇调零。

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 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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	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 μL 标准溶液。

4、加样表：



	测定管	对照管	标准管	空白管
样本(μL)	10	10	-	-
标准品(μL)	-	-	10	-
蒸馏水(μL)	-	10	-	10
试剂一(μL)	40	40	40	40
试剂二(μL)	10	-	10	10
试剂四(μL)	20	20	20	20
在 EP 管中充分混匀, 于 37°C水浴准确反应 20min。				
试剂五(μL)	6	6	6	6
试剂三(μL)	60	60	60	60
37°C避光反应 20min 后于 25°C , 10000rpm 离心 10min, 去上清, 留沉淀。				
乙醇(μL)	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



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

(4)按照液体体积计算

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

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 ΔA 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：

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

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, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 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($\mu\text{mol/mL}$)= $13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.928 = 12.122 \mu\text{mol/mL}$ 。