



## L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒可见分光光度法

中文名称：**L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒可见分光光度法**

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

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；

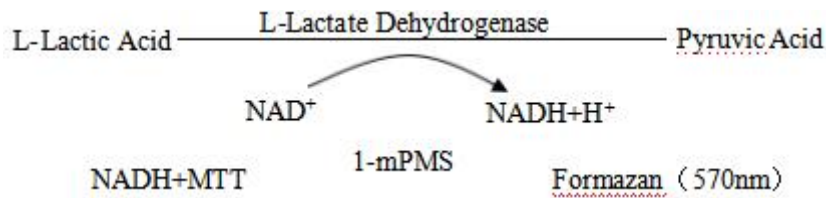
2、试剂四：临用前每瓶加入 8 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存，避免反复冻融，-20℃

保存 4 周;

3、标准品: 临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 $\mu$ 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  $\text{NAD}^+$  还原生成  $\text{NADH}$  和  $\text{H}^+$ ,  $\text{H}^+$  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: 0.0387  $\mu$ mol/mL

线性范围: 0.039- 1  $\mu$ 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、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

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  $5 \times 10^6$  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  $4^{\circ}\text{C}$ ，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， $4^{\circ}\text{C}$  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， $4^{\circ}\text{C}$  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( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积( $\mu\text{L}$ )	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

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

##### (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，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：

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