

乳酸（LA）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC2235

规格：100T/48S

产品内容：

提取液一：液体50mL×1瓶，4℃保存。

提取液二：液体8mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体34 μ L×1支，4℃保存。临用前按试剂二（V）：蒸馏水（V）=10 μ L：450 μ L的比例配制试剂二溶液，现用现配。

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃避光保存。临用前加入4mL蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1瓶，4℃避光保存。临用前加4mL蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1瓶，-20℃避光保存。临用前每瓶加入3mL蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。

标准品：粉剂×1支，4℃保存。临用前加入1.04mL蒸馏水配成100 μ mol/mL的标准溶液。

显色液的配制：临用前根据用量按照试剂三（V）：试剂四（V）=1：1的比例充分混匀，现配现用。

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。

自备实验用品及仪器：

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℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.12mL提取液二，12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入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℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.12mL提取液二，12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清（浆）：取100 μ L血清（浆）加入1mL提取液一，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.12mL提取液二，12000g离心10min后取上清待测。

二、测定操作

1、分光光度计/酶标仪预热30min，波长调至570nm，乙醇调零。

2、标准液的稀释：将100 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液用蒸馏水稀释为2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液待测。

3、加样表：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样品 (μL)	10	10	-	-
标准品 (μL)	-	-	10	-
蒸馏水 (μL)	-	-	-	10
试剂一 (μL)	40	50	40	40
试剂二 (μL)	10	-	10	10
显色液 (μL)	60	60	60	60
试剂五 (μL)	20	20	20	20
在 EP 管中充分混匀，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴准确反应 20min，于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管； ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。				

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 (ΔA 标准) 为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 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

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

(2) 按照样本质量计算

$$\text{LA含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.15 \times x \div W。$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{LA含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (500 \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 0.0023 \times x。$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{LA含量} (\mu\text{mol/mL}) &= x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \\ &= 12.65 \times x。 \end{aligned}$$

V样品：加入的样品体积，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，0.12mL； V提取液一：加入的提取液一体积，1mL； 500：细胞数量，500万个； V液体：液体样本体积，0.1mL。

注意事项：

若测定吸光值超过1.2或 ΔA 大于0.8，请将样品体积进行适当的稀释后再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。