



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**

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

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

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



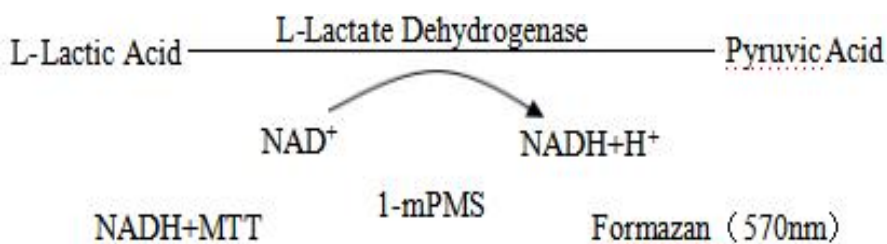
现配；

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 100μmol/mL 的标准溶液 2-8℃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：0.0387 μmol/mL

线性范围： 0.039- 1 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。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℃，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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁶个)：提取液一体积 (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）；于 4℃，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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取 100μL 液体加入 1mL 提取液一，4℃ 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 100μmol/mL 的标准溶液用蒸馏水稀释为 1、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039μmol/mL 的标准溶液待测。

3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度(μmol/mL)	标准溶液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(μmol/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 μ L 标准溶液。

4、加样表：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本(μ L)	50	50	-	-
标准品(μ L)	-	-	50	-
蒸馏水(μ L)	-	50	-	50
试剂一(μ L)	200	200	200	200
试剂二(μ L)	50	-	50	50
试剂四(μ L)	100	100	100	100
混匀，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅/恒温培养箱中培养 1h				
试剂五(μ L)	30	30	30	30
试剂三(μ L)	300	300	300	300
37 $^{\circ}$ C 避光反应 20min 后于 25 $^{\circ}$ C，10000rpm 离心 10min，去上清，留沉淀。				
乙醇(μ L)	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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 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(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(μ mol/mL)。

2、乳酸含量计算

(1) 按照蛋白含量计算

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

(2) 按照样本质量计算

$$L-LA \text{ 含量}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = x \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div (W \times V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) = 1.1875$$



$$x \times W$$

(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

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

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($\mu\text{mol}/\text{g}$ 质量) = $1.1875 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 1.1875 \times 1.266 \div 0.1 \times 5 = 75.17 \mu\text{mol}/\text{g}$ 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，测得计算 ΔA 测定 = A 测定管 - A 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(μ mol/mL) = $13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.924 = 12.07 \mu$ mol/mL。