



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**

英文名称：Lactic Acid(LA) Content Assay Kit

产品别名：L-乳酸含量试剂盒 LAKit 乳酸含量(LA)试剂盒 乳酸含量(LA)测试盒

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

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 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：



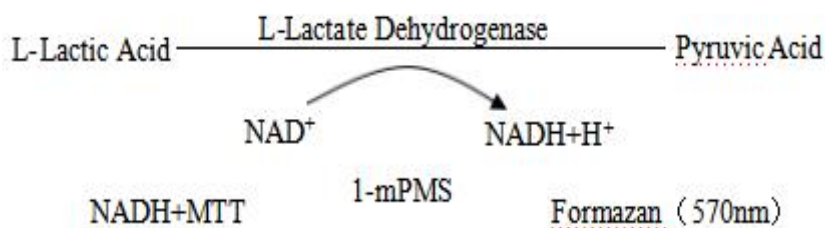
1, 试剂二: 临用前按试剂二 (V) : 蒸馏水 (V) =10 μ L: 450 μ L 的比例配制试剂二溶液, 现用现配;

2, 试剂四: 临用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水混匀, 可分装后-20 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融, -20 $^{\circ}$ C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℃, 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, 分光光度计用乙醇调零。

2、标准液的稀释: 将 100μmol/mL 的标准溶液用蒸馏水稀释为 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078μmol/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	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 μ 标准溶液。

4、加样表：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本(μ L)	10	10	-	-
标准品(μ L)	-	-	10	-
蒸馏水(μ L)	-	10	-	10
试剂一(μ L)	40	40	40	40
试剂二(μ L)	10	-	10	10
试剂四(μ L)	20	20	20	20
在 EP 管中充分混匀，于 37 $^{\circ}$ C 水浴准确反应 20min。				
试剂五(μ L)	6	6	6	6
试剂三(μ L)	60	60	60	60
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)	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。（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 $x(\mu\text{mol/mL})$ 。

2、乳酸含量计算

(1) 按照蛋白含量计算



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

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细胞数量计算

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

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：

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

2、取 100 μL 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($\mu\text{mol/mL}$) = $13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.928 = 12.122 \mu\text{mol/mL}$ 。