



L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒

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°C

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°C保存 |
| 提取液二 | 液体 5 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂一 | 液体 20 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二 | 液体 60mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂三 | 液体 24mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂五 | 液体 5 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 2-8°C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



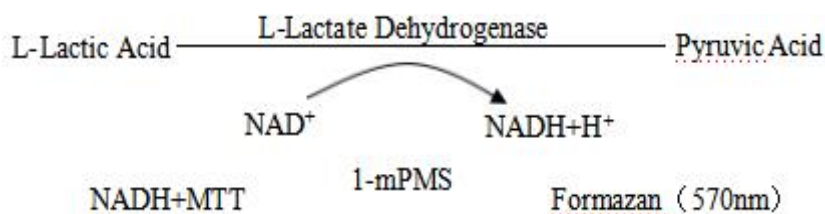
现配;

2、试剂四: 临用前每瓶加入 8 mL 蒸馏水混匀, 可分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融, -20°C 保存 4 周;

3、标准品: 临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 $100\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液 $2-8^{\circ}\text{C}$ 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: $0.0387\ \mu\text{mol/mL}$

线性范围: $0.039-1\ \mu\text{mol/mL}$

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(可适当调整待测样本量)

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 (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℃, 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 100 μ L 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 100 μ mol/mL 的标准溶液用蒸馏水稀释为 1、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039 μ mol/mL 的标准溶液待测。

3、标准品稀释表:

| 序号 | 稀释前浓度(μ mol/mL) | 标准溶液体积(μ L) | 蒸馏水体积(μ L) | 稀释后浓度(μ mol/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。(标管和空白管只需做 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

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



(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

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

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