

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0488

Size: 100T/48S

乳酸含量 (LA) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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 还原特异性底物, 在 450nm 处有特征吸收峰。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 0.6ml 试剂一充分溶解。可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	临用前加入 6mL 试剂一充分溶解；可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	临用前每瓶加入 6mL 试剂一混匀，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂五	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	临用前加入 1.04mL 提取液配成 100μmol/mL 的标准溶液
工作液配制：临用前根据用量按照试剂三（V）：试剂四（V）：试剂五（V）=1：1：0.5 的比例充分混匀，现配现用。			

五、操作步骤：

● 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）加入提取液，冰浴匀浆后于 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 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），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 后取上清待测。

（3）血清（浆）：取 100μL 血清（浆）加入 0.9mL 提取液，4℃12000g 离心 10min 后取上清待测。

● 测定操作

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min，波长调至 450nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 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 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0 $\mu\text{mol/mL}$ 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	—	10
试剂一 (μL)	40	40	40	40
试剂二 (μL)	10	—	10	10
工作液 (μL)	140	140	140	140
于 37°C 准确反应 20min。于 450nm 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。				

六、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

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

(2) 按照样本质量计算

LA 含量 ($\mu\text{mol/g 鲜重}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = x \div W$ 。

(3) 按照细胞数量计算

LA 含量 ($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = x \div \text{细胞数量}$ 。

(4) 按照液体体积计算

LA 含量 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $10 \times x$ 。

V 样品: 加入的样品体积, 0.01mL。: W: 样本质量, g/mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; V 提取液: 加入的提取液体积, 1mL; 5: 细胞数量, 5×10^6 个; V 液体: 液体样本体积 0.1mL。

七、注意事项:

1. 若测定吸光值 ΔA 大于最大浓度标准品 OD 值, 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。
2. 本试剂盒采用 WST-8 法检测原理, 不同于 NBT 法, 且具有无毒无害, 显色底物溶解性好, 显色稳定等优点, 深受广大科研工作者的青睐。