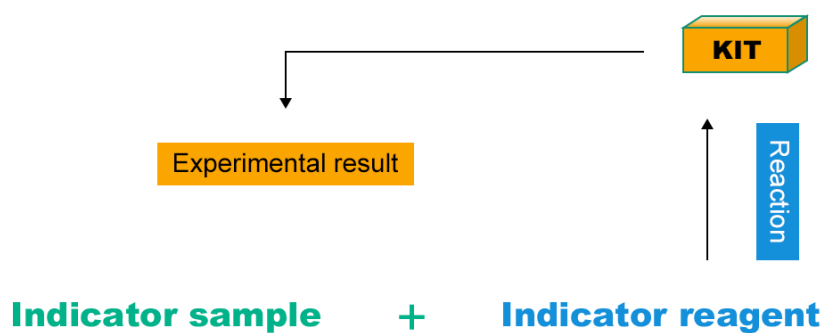


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0770

Size: 50T/24S

乳酸含量 (LA) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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 PMSH_2 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、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 30mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20°C 保存	临用前加入 1.6ml 试剂一充分溶解。可分装后-20°C保存,避免反复冻融;
试剂三	粉剂 × 1 瓶	-20°C避光保存	临用前加入 16mL 试剂一充分溶解;可分装后-20°C保存,避免反复冻融;
试剂四	粉剂 × 1 瓶	-20°C避光保存	临用前每瓶加入 16mL 试剂一混匀,可分装后-20°C保存,避免反复冻融;

试剂五	液体 8mL×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 100μmol/mL 的标准溶液
工作液的配制	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 (10^6 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 100μmol/mL 的标准溶液用蒸馏水稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0μmol/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)	50	50	—	—
标准品 (μL)	—	—	50	—
蒸馏水 (μL)	—	50	—	50
试剂一 (μL)	200	200	200	200
试剂二 (μL)	50	—	50	50
工作液 (μL)	700	700	700	700

于 37℃ 准确反应 30min。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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ； $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

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 ($\Delta A_{\text{标准}}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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

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

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细胞数量计算

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

(4) 按照液体体积计算

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

V 样品: 加入的样品体积, 0.05mL。: 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; 细胞数量, 5×10^6 个。

七、注意事项:

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。