

乳酸含量 (lactic acid, LA) 试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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 INT 生成红色物质，在 530nm 处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器

天平、研钵、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制

提取液：液体 110mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 2mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 支，-20℃ 避光保存。临用前加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 6mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1 支，4℃ 避光保存。

标准品：液体 1mL×1 支，4℃ 保存。

显色液：临用前根据用量按照提取液 (V)：试剂三 (V)：试剂四 (V)：试剂五 (m)=1 (mL)：0.3 (mL)：3 (mL)：15 (mg) 的比例充分混匀。(注意：现配现用，用多少配多少，在棕色瓶中配制，试剂盒中带有 4 个棕色空瓶)

样本处理

1. 组织：按照质量 (g)：提取液体积 (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，取上清测定。
2. 细胞：按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (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，取上清测定。
3. 血清：直接测定。

测定操作

	样品对照管	样品测定管	标准对照管	标准测定管
样品 (μL)	10	10		
标准品 (μL)			10	10
H_2O (μL)	60	90	60	90
试剂一 (μL)	30		30	
试剂二 (μL)	40	40	40	40
显色液 (μL)	60	60	60	60
充分混匀，于 37℃ 反应 30min，于微量石英比色皿/96 孔板，测定 530nm 处吸光值，分别记为 A1, A2, A3, A4, $\Delta A_{\text{样}} = A2 - A1$; $\Delta A_{\text{标}} = A4 - A3$				

注意：标准对照管和标准测定管只需测定一次，每个样品测定管设一个样品对照管

计算公式

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \times C_{\text{标}} \div \text{Cpr} \\ &= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \times C_{\text{标}} \div W \\ &= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W\end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \times C_{\text{标}} \div \text{细胞数量} \\ &= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) &= \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \times C_{\text{标}} \\ &= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}\end{aligned}$$

C 标：标准品浓度，2mmol/L；W：样本质量，g/mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL

注意事项

1. 若吸光值超过 2，请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. 最低检出限为 1.8 $\mu\text{mol/L}$ 。