

乳酸含量（lactic acid, LA）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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 PMSH₂ 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、1 mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 55mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 12mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 支，-20℃避光保存。临用前加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前加 15mL 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 5 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 (10⁴ 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)	50	50		
标准品 (μL)			50	50
H ₂ O (μL)	300	450	300	450
试剂一 (μL)	150		150	
试剂二 (μL)	200	200	200	200
显色液 (μL)	300	300	300	300

充分混匀, 于 37℃ 反应 30min, 于 1mL 玻璃比色皿, 蒸馏水调零, 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:

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

$$= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{pr}}$$

2.按照样本质量计算

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

$$= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W$$

3.按照细胞数量计算

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

$$= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{细胞数量}$$

4.按照液体体积计算

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

$$= 2 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}$$

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 $\mu\text{mol/L}$ 。