

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 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、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, ΔA 样=A2-A1; ΔA 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：

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

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

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 $\mu\text{ mol/L}$ 。