

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<sup>+</sup>还原生成NADH和H<sup>+</sup>，H<sup>+</sup>传递给PMS生成的PMSH<sub>2</sub>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°C保存。

试剂一：液体2mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体5mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：粉剂×1支，-20°C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°C避光保存。临用前加6mL蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1支，4°C避光保存。

标准品：液体1mL×1支，4°C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°C，12000g 离心 10min，取上清测定。
2. 细胞：按照细胞数量 (10<sup>4</sup>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°C，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 <sub>2</sub> O (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°C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

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

##### 2. 按照样本质量计算

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

##### 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

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

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

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。

最低检出限为1.8μmol/L。