

L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10407

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

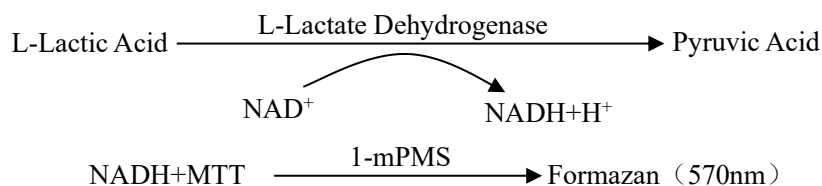
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 8mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂五	液体 2 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前按试剂二 (V)：蒸馏水 (V) =10μL：450μL 的比例配制试剂二溶液，现用现配；
- 2、试剂四：临用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20°C保存，避免反复冻融，-20°C保存 4 周；
- 3、标准品：临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 μmol/mL 的标准溶液；2-8°C保存 4 周。

产品说明：

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。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MTT生成紫色物质，在570nm处有特征吸收峰。



技术指标：

最低检出限：0.0771 μmol/mL

线性范围：0.078-5 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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/96孔板、恒温水浴锅、乙醇和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后于4°C，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C 12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁶个）：提取液一体积（mL）为5~10：1的比例（建议5×10⁶个细胞加入1mL提取液一），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0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C 12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取100μL液体加入1mL提取液一，4°C 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，12000g离心10min后取上清待测。

注：提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，波长调至570nm，分光光度计用乙醇调零。
- 2、标准液的稀释：将100μmol/mL的标准溶液用蒸馏水稀释为2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078μmol/mL的标准溶液待测。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度 μmol/mL）
1	100	50	450	10
2	10	100	300	2.5
3	2.5	200	200	1.25
4	1.25	200	200	0.625
5	0.625	200	200	0.3125
6	0.3125	200	200	0.15625
7	0.15625	200	200	0.078

实验中每个标准管需10μL标准溶液。

4、加样表：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（μL）	10	10	-	-
标准品（μL）	-	-	10	-
蒸馏水（μL）	-	10	-	10
试剂一（μL）	40	40	40	40
试剂二（μL）	10	-	10	10
试剂四（μL）	20	20	20	20
在 EP 管中充分混匀，于 37°C 水浴准确反应 20min。				
试剂五（μL）	6	6	6	6
试剂三（μL）	60	60	60	60
37°C避光反应 20min 后于 25°C，10000rpm 离心 10min，去上清，留沉淀。				

乙醇 (μL)	200	200	200	200
充分溶解沉淀后, 于 570nm 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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管; ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。(标曲和空白管只需做 1-2 次)				

三、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 (ΔA 标准) 为y轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中得到x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2、乳酸含量计算

(1) 按照样本蛋白浓度计算

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

(2) 按照样本质量计算

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.1875 \times x \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \div N = 1.1875 \times x \div N$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] = 13.0625 \times x$$

V 样本: 加入的样本体积, 0.01mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定;
 V 上清: 提取时上清液体积, 0.8mL; V 提取液二: 加入提取液二的体积, 0.15mL; V 提取液一: 加入的提取液一体积, 1mL; N: 细胞数量, 以百万计; V 液体: 液体样本体积, 0.1mL。

注意事项:

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
2. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取样本。

实验实例:

- 1、取 0.1g 兔心加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨离心, 取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二, 离心取上清后稀释 5 倍, 之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.591-0.069=0.522, 根据标准曲线 $y=0.412x-0.0214$, $x=1.319$, 按样本质量计算含量得:

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = 1.1875 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 1.1875 \times 1.319 \div 0.1 \times 5 = 78.32 \mu\text{mol/g 质量}。$$

- 2、取 100μL 小鼠血清加入 1mL 提取液一, 取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二, 离心取上清, 之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.572-0.211=0.361, 根据标准曲线 $y=0.412x-0.0214$, $x=0.928$, 按照液体体积计算含量得:

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = 13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.928 = 12.122 \mu\text{mol/mL}。$$

相关发表文献:

[1] Meixi Peng, Dan Yang, Yixuan Hou, et al. Intracellular citrate accumulation by oxidized ATM-mediated metabolism reprogramming via PFKF and CS enhances hypoxic breast cancer cell invasion and metastasis. Cell Death and Disease. March 2019; (IF5.959)

[2] Xiaojin Luo, Weihua Shi, Haoming Yu, et al. Wearable Carbon Nanotube-Based BioSensors on Gloves for Lactate. Sensors. October 2018; (IF3.031)

[3] Zhou F, Du J, Wang J. Albendazole inhibits HIF-1 α -dependent glycolysis and VEGF expression in non-small cell

lung cancer cells[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2017, 428(1-2): 171-178.

参考文献:

[1] Jin Bingjun, Li Taiyuan, Zhang Chunfeng. Determination of lactic acid concentration in bovine blood by enzymatic method [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1990, 16(07): 23-25.

[2] Eolbergrová J, MacMillan V, Siesjö B K. The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/NAD⁺ ratio of the rat brain[J]. Journal of neurochemistry, 1972, 19(11): 2497-2505.

相关系列产品:

AC10198/AC10199 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒

AC10162/AC10163 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒

AC10160/AC10161 磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒