

**乳酸含量 ( lactic acid , LA ) 试剂盒说明书****微量法 100T/48S**

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

**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  $\text{NAD}^+$  还原生成  $\text{NADH}$  和  $\text{H}^+$ ， $\text{H}^+$  传递给 PMS 生成的  $\text{PMSH}_2$  还原 INT 生成红色物质，在 530nm 处有特征吸收峰。

**组成：**

产品名称	HYKC023-100T/48S	Storage
提取液：液体	110ml	4℃
试剂一：液体	2ml	4℃
试剂二：液体	5ml	4℃
试剂三：粉剂	1 支	-20℃避光
试剂四：粉剂	1 瓶	4℃避光
试剂五：粉剂	1 支	4℃避光
标准品：液体	1ml	4℃
说明书	一份	

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。

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）

**自备仪器和用品：**

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。

**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<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℃，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（ $\mu\text{l}$ ）	10	10		
标准品（ $\mu\text{l}$ ）			10	10
H <sub>2</sub> O（ $\mu\text{l}$ ）	60	90	60	90
试剂一（ $\mu\text{l}$ ）	30		30	
试剂二（ $\mu\text{l}$ ）	40	40	40	40
显色液（ $\mu\text{l}$ ）	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、A4、A3、A2-A1、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

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

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

##### 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 $\mu\text{mol/L}$ 。