

乳酸含量 (LA) 检测试剂盒 (分光光度法)

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。

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：

- 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。
- 细胞：**按照细胞数量 (10^4 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。
- 血清：**直接测定。

测定步骤:

	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°C 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

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

2. 按照样本质量计算

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

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

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

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:

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 1.8μmol/L。