

乳酸含量 (lactic acid, LA) 试剂盒说明书

分光光度法 50T/24S

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 ，使 WST-8 显橙黄色，在 450nm 下有最大吸光值。

自备实验用品及仪器

天平、研钵、离心机、分光光度计、1mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅或烘箱。

试剂组成和配制

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4°C 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20°C 保存。临用前加入 50mL 试剂一充分溶解。用不完的试剂分装后 -20°C 保存；

试剂三：液体×1 支，4°C 保存。临用前加 1.5mL 蒸馏水充分溶解。用不完的试剂分装后 -20°C 保存，禁止反复冻融；

试剂四：液体×1 瓶，4°C 保存。临用前加 3mL 蒸馏水充分溶解。用不完的试剂分装后 -20°C 保存，禁止反复冻融；

试剂五：液体 3mL×1 支，4°C 避光保存。

样本处理

1. 组织：按照质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 试剂一）加入试剂一，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 (10^4 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），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，取上清测定。
3. 血清等液体样本：直接测定。

测定操作

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
2. 工作液配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液

试剂名称 (μL)	测定工作液	对照工作液
试剂二	800	800
试剂三	50	
蒸馏水		50
试剂四	50	50
试剂五	50	50

3. 样本测定：按下表在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
测定工作液	950	
对照工作液		950

混匀，37°C 避光孵育 30min，10min 内转移反应液至 1mL 玻璃比色皿，于 450nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

计算公式

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.2208x - 0.0382$, $R^2 = 0.9995$; x 为乳酸含量 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值。

1. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0382) \div 0.2208 \times V1 \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 4.53 \times (\Delta A + 0.0382) \div W\end{aligned}$$

2. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0382) \div 0.2208 \times V1 \div (V1 \times Cpr) \\ &= 4.53 \times (\Delta A + 0.0382) \div Cpr\end{aligned}$$

3. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A + 0.0382) \div 0.2208 \\ &= 4.53 \times (\Delta A + 0.0382)\end{aligned}$$

4. 按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned}\text{LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0382) \div 0.2208 \times V1 \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.009 \times (\Delta A + 0.0382)\end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万;

注意事项

1. 若 ΔA 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. 乳酸含量过高会抑制反应, 可以将待测样本适当稀释后测定。