乳酸含量(lactic acid，LA)试剂盒

试剂盒使用说明书

本试剂盒只能用于科学研究，不得用于医学诊断

▶ 产品包装

货号	名称	规格
ZX-AD1138	乳酸含量(lactic acid，LA)试剂盒	48T/96T

▶ 指标介绍

乳酸含量的异常升高与多种疾病如糖尿病和酸毒症等疾病有密切关系。L-乳酸是人体中乳酸代谢的主要中间产物，并且存在于血液中。D-乳酸也存在，但含量极低只有L-乳酸的1-5%。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法：乳酸在乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸，并使NAD+还原生成NADH；为了使该反顺利进行另添加酶进一步分解丙酮酸；生成NADH与特异显色剂反应产生在450nm处有最大吸收峰的有色物质，通过检测该物质在450nm的增加量，进而计算出乳酸含量。

▶ 试剂盒组成和配制

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1 支	4℃保存	1. 临用前加1.1ml蒸馏水； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
试剂五	液体 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4 ℃ 离心 2mim使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支分别加0.55mL蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	液体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

▶ 实验器材

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

▶ 指标测定

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取:

① 组织样本：0. 1g 组织样本，加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中， 12000rpm，离心10min， 上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1： 5~ 10 的比例提取

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内， 离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液； 超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s， 间隔 10s，重复 30 次）；于 4℃， 12000g 离心10min，取上清测定。

【注】：若增加样本量，可按细菌/细胞数量（104 个）：提取液（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

③ 液体样品：

a. 近似中性的液体样品可直接取 1mL 转移到 EP 管中； 12000rpm，离心 10min， 上清液待测。

b. 酸性液体样本，则需先用 KOH（5M）调溶液的PH 值至约 8，并在室温下孵育 30 分钟。取 1mL转移到 EP 管中；12000rpm， 离心 10min， 上清液待测。

④ 血清样本：澄清的血清样本可以直接检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 临用前试剂一、二、三、四可按照比例 20:10:130:10 混成混合液（用多少配多少量），下步加样表中直接加 170μL 混合液。

③ 所有试剂解冻至室温（25℃）或在水浴锅（25℃） 中孵育 10min，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	20	0
试剂一	20	20
试剂二	10	10
试剂三	130	150
试剂四	10	10
试剂五	10	10
混匀， 立即于 37℃条件下避光反应 30min， 于 450nm 处读取吸光值 A，▵A=A 测定-A 空白。		

【注】1. 若样本自身有很强的背景值（如颜色很深或含有还原性物质如抗坏血酸等），可以加设一个样本自身对照:

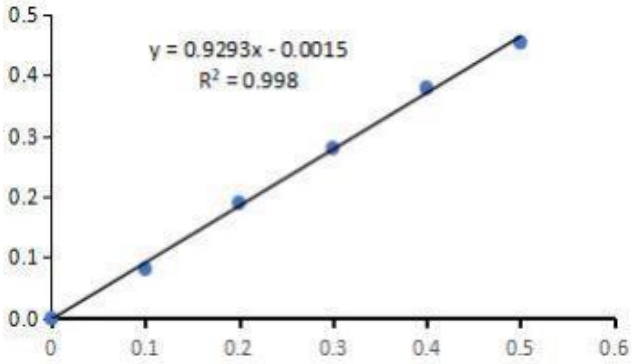
即试剂五用蒸馏水替代，其他试剂保持不变，则△A=A 测定-A 对照。

2. 若△A 值较小，可增加样本上样量V1（如增至40μL，则试剂三相应减少），则改变后的V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若△A 值较大，或A 测定超过了标曲最高点，可对样本用蒸馏水稀释；或减少样本上样量V1（如减至10μL，则试剂三相应增加），则稀释倍数D 和改变后V1 代入公式重新计算。

▶ 结果计算

1、标准曲线：y = 0.9293x - 0.0015；x 为标准品摩尔浓度 （μmoL/mL），y 为△A。



2、按照样本质量计算：

乳酸(μmol/g 鲜重)=[(△A+0.0015)÷0.9293×V2]÷(W×V1÷V)×D= 10.76×(△A+0.0015)÷W×D

3、按照样本蛋白浓度计算：

乳酸(μmol/mg prot)=[(△A+0.0015)÷0.9293×V2]÷(Cpr×V1÷V)×D= 10.76×(△A+0.0015)÷Cpr×D

4、按照细菌/细胞计算：

乳酸含量(μmol/10^4 cell)=[(△A+0.0015)÷0.9293×V2]÷(500×V1÷V)×D=0.0215×(△A+0.0015)×D

5、按照液体体积计算：

乳酸含量(μmol/mL)=[(△A+0.0015)÷0.9293×V2]÷V1×D= 10.76×(△A+0.0015)×D

6、按照血清体积计算：

乳酸含量(μmol/mL)=[(△A+0.0015)÷0.9293×V2]÷V1×D= 10.76×(△A+0.0015)×D

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL；　　W---样本质量，g；

500---细胞数目，万；　　D---稀释倍数，未稀释即为 1；　乳酸分子量 Mr---90.08。

附：标准曲线制作过程：

1、 临用前取 1mL 蒸馏水至 2mLEP 管中，再向 1mL 蒸馏水中加入 3μL 的标准品，混匀，即得标准品母液浓度为 30μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2、标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 30uL，加入 870uL 蒸馏水，混匀得到 1μmol/mL 的标品稀释液； 2. 吸取 1μmol/mL 的标品稀释液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度μmol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

标品稀释液uL	0	40	80	120	160	200
水uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3、依据测定管加样表操作，根据结果， 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	20	20
试剂二	10	10
试剂三	130	130
试剂四	10	10
试剂五	10	10
混匀，立即于 37℃条件下避光反应 30min，于 450nm 处读取吸光值 A，▵A=A 测定-0 浓度管。		