

乳酸含量

规格：微量法 96 样

编号：LA.W-W96-N(1720)

检测原理：WST-8 法

检测波长：450nm

注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

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^+ ， NADH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-8 显橙黄色，通过测定 450nm 下吸光值变化即可测得乳酸含量。

自备仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、恒温箱、震荡仪、冰、蒸馏水

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 110mL	x1	4°C	
试剂一	液体 10mL	x1	4°C	
试剂二	粉剂	x1	-20°C,避光	
试剂三	粉剂	x1	-20°C	
试剂四	液体 1.2mL	x1	-20°C,避光	
标准品母液	粉剂	x1	4°C	1.2mg 乳酸锂 标准粉剂

样本处理（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

- 1、按照质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例加入提取液，冰浴匀浆；
(样本取样量记为 W，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 0.1g：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 12,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清测定。

二、细菌/细胞样本

- 1、按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例加入提取液，冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min)；
(样本取样量记为 N (万个)，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 500 万：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 12,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清测定。

三、液体样本

澄清样本可直接检测，若浑浊则离心取上清检测；

实验准备：

- 1、试剂二的制备：瓶中加入 6mL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20℃ 避光保存)
- 2、试剂三的制备：瓶中加入 5mL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20℃ 保存；不可反复冻融，建议根据每次使用量分装保存)
- 3、标准品的制备：
 - 1) 标准品母液 管中加入 1.25mL 蒸馏水，充分溶解，即为 10μmol/mL 乳酸标准溶液；
 - 2) 按照标准品母液：蒸馏水=1：19 比例混匀，即为标准品 (0.5μmol/mL)，待用；

(试剂三、标准品母液 为微量粉剂，开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后小心开盖)

- 4、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm；
- 5、恒温箱加热至 37℃；
- 6、工作液 I 的配制：

试剂名称 (μL)	工作液 I (100μL)
试剂二	50
试剂三	40
试剂四	10
混匀，用多少配多少，现用现配 避光冰上放置	

(试剂三酶液易沉降，吸取时震荡混匀)

- 7、工作液 II 的配制：(*选做，仅用于对照管使用)

试剂名称 (μL)	工作液 II (100μL)
试剂二	50
蒸馏水	40
试剂四	10
混匀，用多少配多少，现用现配 避光冰上放置	

测定操作:

1、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	样本对照管 (*选做)	标准管 (*只做一管)	空白管 (*只做一管)
样本	10	10		-
标准品	-	-	10	-
蒸馏水	-	-	-	10
试剂一	90	90	90	90
工作液 I	100	-	100	100
工作液 II	-	100	-	-

混匀, 37°C 避光反应 30min, 于 450nm 测定吸光值 A

$$\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} \text{ 或 } \Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$$

$$\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$$

注意:

- 1、样本含有 NADH、NADPH 等物质时会干扰检测, 或样本存在很强的背景值时, 需要设立对照管; (若每个样本都做对照管则该试剂盒由原来可测 96 样变为 48 样)
- 2、若 $\Delta A_{\text{样}} > 1$ 则超出试剂盒线性范围, 建议将样本用提取液稀释后测定, 稀释倍数(D)代入公式计算;
- 3、若 $\Delta A_{\text{样}} < 0.02$, 建议尝试增加样本取样量(W 或 N)测定, 或减少提取液用量以提高样本浓度; 或者可以适当增加样本加样体积($V_{\text{样}}$), 如增加至 40μL (对照管等同, 标准管 10uL 标准品+30uL 水, 空白管 40uL 水, 其他试剂不变)

参考下表:

试剂名称 (μL)	测定管	样本对照管	标准管	空白管
样本	40	40		-
标准品	-	-	10	-
蒸馏水	-	-	30	40

(改变的数据代入公式重新计算: $V_{\text{样}}=0.04\text{mL}$, $V_{\text{标}}=0.01\text{mL}$)

结果计算：

(1) 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div \text{Cpr} \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{g}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (W \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W \times D\end{aligned}$$

(3) 按照细菌/细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (N \div V_{\text{提}}) \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \div N \times D\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{乳酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}} \times D\end{aligned}$$

V_样: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL;

V_提: 加入提取液体积, 1mL;

V_标: 加入反应体系中标准品体积, 0.01mL;

W: 样本质量, g;

C: 标准品浓度, 0.5μmol/mL;

N: 细菌/细胞数量, 万个;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

附：标准曲线的绘制（选做）

- 1、将标准品母液(10 μ mol/mL) 使用蒸馏水稀释为 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μ mol/mL;
(也可根据自身实验需求调整标准品浓度)
- 2、依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线
 - 1) 在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μ L)	标准管	空白管 (*只做一管)
标准品	10	-
蒸馏水	-	10
试剂一	90	90
工作液 I	100	100
混匀，37°C 避光反应 30min 于 450nm 测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

- 3、以标准品浓度 (μ mol/mL) 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$) 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，即可得到线性方程 $y=kx+b$;