

乳酸 (LD) 测试盒

(货号: BC093 测血清、组织等 50 管/48 样)

一、测定原理:

以 NAD^+ 为氢受体, LDH 催化乳酸(Lactic Acid)脱氢产生丙酮酸, 使 NAD^+ 转化成 NADH 。其中 PMS 递氢使 NBT 还原为紫色呈色物, 呈色物的吸光度在 530nm 时与乳酸含量成线性关系。

二、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 酶稀释液 60mL×1 瓶, 2°C ~ 8°C 保存。

试剂二: 酶贮备液 0.6 mL×1 支, 2°C ~ 8°C 保存。

酶工作液配制: 临用前将试剂二 (酶贮备液) 和试剂一 (酶稀释液) 按照 1 : 100 的体积比进行混合, 现用现配, 2°C ~ 8°C 保存当天有效。

试剂三: 黄色透明液体 6 mL×2 瓶, 2°C ~ 8°C 避光保存。

试剂四: 粉剂×2 支, 短期 (1 个月内) 使用可放 4°C ~ 8°C 冰箱, 长期存放请置 -20°C 以下。(注:粉剂量较少,可能附着于管壁或盖子上,并非空管,如使用时肉眼不可见,可将其 4000 转/分钟离心 2 分钟后使用)

显色剂的配制: 取 1 支试剂四粉剂溶于 1 瓶试剂三溶液中, 混匀, 使二者充分混合溶解, 配成显色剂, 2°C ~ 8°C 避光保存 2 周内用完。

试剂五: 终止液, 60 mL×2 瓶, 2°C ~ 8°C 保存。

试剂六: 3mmol/L 标准品, 2mL×1 支, 2°C ~ 8°C 保存。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (530nm) 及 96 孔板), 37°C 水浴锅或恒温箱, 涡旋混匀器, 蒸馏水。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

血清 (浆)、培养液等液体样本: 直接使用 (如有固体存在, 可 4000rpm/min 离心 5min 后取上清检测);

组织样本: 准确称取组织重量, 按重量 (g) : 体积 (mL) = 1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取匀浆上清液待测;

细胞样本: 将收集好的细胞, 用 PBS 清洗 1~2 次后, 低速 (1000rpm/min) 离心 5 分钟收集沉淀细胞, 往细胞沉淀中加入 0.3~0.5mL (0.1M、PH 7.4) 的等渗 PBS 缓冲液悬浮细胞, 超声 (功率 300W 或 20%, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复运行 3-5min) 或手动研磨破碎细胞, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取匀浆上清液待测。

注: 上述组织或细胞匀浆上清液可测定其蛋白浓度 (蛋白测定试剂盒本公司有售) 用于计算;

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水 (mL)	0.02		
3mmol/L 标准品 (mL)		0.02	
待测样本 (mL)			0.02
酶工作液 (mL)	1	1	1
显色剂 (mL)	0.2	0.2	0.2
混匀, 37°C 水浴准确反应 10 分钟			
终止液 (mL)	2	2	2

混匀, 波长 530 nm, 1 cm光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管吸光值 A(或是每管吸取 200μL 反应液加到 96 孔板中,酶标仪 530nm 处读数)

注: 样本测试前, 需挑取 2 例用生理盐水稀释不同倍数 (推荐 2、5、10 倍), 按操作表做预实验, 选择测定绝对 OD(测定 OD-空白 OD)在 0.05 ~ 0.35 之间的浓度为最佳取样浓度 (如果测定绝对 OD 小于 0.05, 则需要用更高的样本浓度或加大样本上样量重新测定; 如果测定绝对 OD 大于 0.35, 则需要将样本稀释后测定)。

五、计算公式:

1、液体样本(如血清、培养液)中计算公式:

$$\text{乳酸含量 (mmol/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

2、组织(或细胞)按蛋白浓度计算公式:

$$\text{乳酸含量 (mmol/gprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

3、组织按重量计算公式:

$$\text{乳酸含量 (mmol/g组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

4、细胞 (或细菌) 按细胞数计算公式:

$$\text{乳酸含量 (mmol/10}^6\text{细胞)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

$C_{\text{标准}}$:标准品浓度, 3mmol/L;

N :样本测试前稀释倍数;

C_{pr} :匀浆液蛋白浓度,gprot/L(prot 指蛋白);

W : 组织样本重量, g;

$V_{\text{样总}}$: 样本匀浆 (或细胞破碎) 时加入的生理盐水或 PBS 的总体积, L;

细胞总数: 细胞 (或细菌) 在破碎时的细胞的总数量, 10^6 个

六、计算举例:

例 1: 取用生理盐水 1 : 1 稀释血清按操作表进行乳酸测定, 测得各管吸光度, 空白管吸光度为 0.076, 标准管吸光度为 0.384, 测定管吸光度为 0.304。则计算如下:

$$\text{血清乳酸含量 (mmol/L)} = \frac{0.304 - 0.076}{0.384 - 0.076} \times 3 \times 2 = 4.442\text{mmol/L}$$

例 2: 取用生理盐水 1 : 4 稀释的培养液 0.02mL 按操作表进行乳酸测定, 测得各管吸光度, 空白管吸光度为 0.076, 标准管吸光度为 0.384, 测定管吸光度为 0.193。则计算如下:

$$\text{培养液乳酸含量 (mmol/L)} = \frac{0.194 - 0.076}{0.384 - 0.076} \times 3 \times 5 = 5.698\text{mmol/L}$$

例 3: 取 5%的小鼠肝组织匀浆 0.02mL 按操作表进行乳酸测定, 测得各管吸光度为: 空白管吸光度为 0.076, 标准管吸光度为 0.384, 测定管吸光度为 0.357。同时测得 5%肝组织匀浆蛋白浓度为 7.006 gprot/L,则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肝中乳酸含量 (mmol/gprot)} &= \frac{0.357 - 0.076}{0.384 - 0.076} \times 3 \div 7.006 \\ &= 0.391\text{mmol/gprot} \end{aligned}$$

例 4: 取 2%的猪肌肉组织匀浆 0.02mL 按操作表进行乳酸测定, 测得各管吸光度为: 空白管吸光度为 0.076, 标准管吸光度为 0.384, 测定管吸光度为 0.154。同时测得 2%肌肉组

织匀浆蛋白浓度为 1.019gprot/L,则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{猪肌肉中乳酸含量} &= \frac{0.154 - 0.076}{0.384 - 0.076} \times 3 \div 1.019 \\ (\text{mmol/gprot}) & \\ &= 0.746\text{mmol/gprot} \end{aligned}$$

七、注意事项:

- 1、血清、血浆、组织块置于冰箱-20℃冷冻,可保存1个月左右; -70℃冷冻可保存2~3个月。温度越低保存时间越长。解冻后的样本或组织匀浆必须当天测定。
- 2、严重溶血及黄疸会使得测定结果偏高。
- 3、酶标仪读数时注意孔板中不要有气泡。

八、测定意义:

乳酸是糖无氧氧化(糖酵解)的代谢产物。乳酸产生于骨骼,肌肉,脑和红细胞。经肝脏代谢后由肾分泌排泄。血乳酸测定可反映组织氧供和代谢状态以及灌注量不足。乳酸水平的增高可见于多种临床疾病。

本试剂盒适用于检测血清、组织、发酵液、细胞、培养液等中乳酸(LD)的含量。

附录：乳酸标准曲线的制备

1、前处理：

取 6mmol/L 的乳酸标准液（本试剂盒不提供）用蒸馏水稀释成不同浓度：1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L、6mmol/L，进行标准曲线的制备。

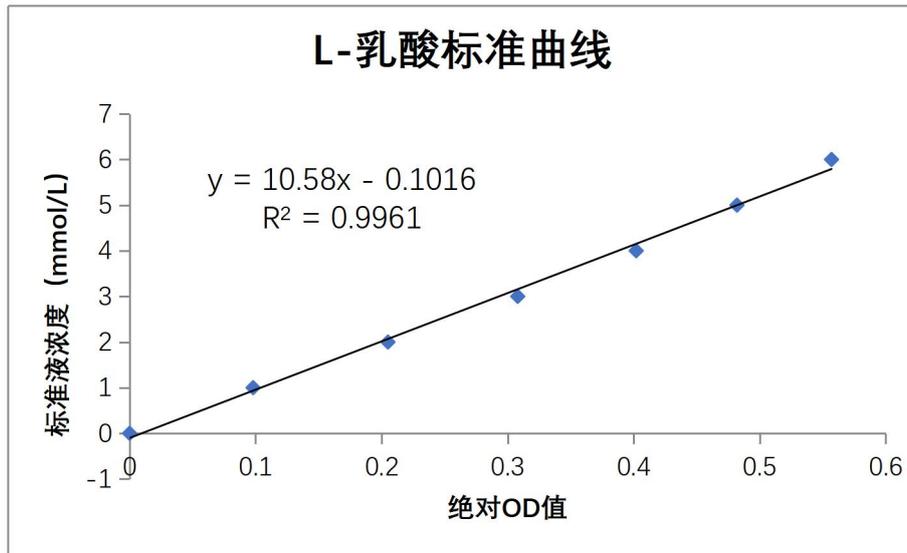
2、操作表：

	空白管	标准管
蒸馏水 (mL)	0.02	
不同浓度的标准品 (mL)		0.02
酶工作液 (mL)	1	1
显色剂 (mL)	0.2	0.2
混匀，37°C 水浴准确反应 10 分钟		
终止液 (mL)	2	2
混匀，波长 530 nm，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值		

3、测定结果：

乳酸标准浓度 (mmol/L)	测定 OD	绝对 OD
0	0.076	0
1	0.174	0.098
2	0.281	0.205
3	0.384	0.308
4	0.478	0.402
5	0.558	0.482
6	0.633	0.557

4、绘图如下：



[注] 标准曲线用户可以不测，对计算结果无影响。如有需要，可另购高浓度标准品。