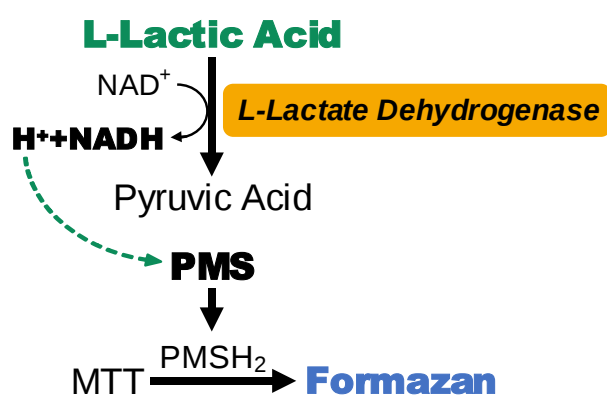




L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒 (MTT 法)

L-Lactic Acid (L-LA) Content Assay Kit (MTT Method)



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒 (MTT 法)

L-Lactic Acid (L-LA) Content Assay Kit (MTT Method)

一、产品描述

乳酸是生物体代谢过程中重要的中间产物，既是糖酵解供能系统的终产物，又是有氧代谢供能系统的氧化基质，在机体能量代谢、氧化还原信号传导和脂质代谢等过程中具有重要作用，其含量可作为评估有氧代谢和糖原代谢的重要指标，并且在医药、农业、工业和食品科学等领域具有广泛应用。

L-乳酸脱氢酶 (L-LDH) 能够催化 L-乳酸生成丙酮酸，同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ ，进一步通过 PMS 的递氢作用，还原氧化型噻唑蓝 (MTT) 生成甲臞，产物在 570 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测 L-乳酸的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 40 μL ×1 瓶	4°C 避光保存	使用前按试剂二：蒸馏水=1:45 的体积比配制 (根据使用量现用现配，充分混匀后使用)
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 2 周，避免反复冻融)
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 周，避免反复冻融)
试剂六	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存 1 周)
试剂七	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂八	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 100 $\mu\text{mol/mL}$ L-乳酸标准液)
标准稀释液的制备 (现用现配)：使用前将 100 $\mu\text{mol/mL}$ L-乳酸标准液使用蒸馏水稀释至 2.5、2.0、1.6、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样品量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：吸取 100 μL 液体样本加入 1 mL 提取液 A，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm。

②标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 100 μmol/mL L-乳酸标准液使用蒸馏水稀释至 2.5、2.0、1.6、0.8、0.4、0.2 μmol/mL 即为标准稀释液。

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度（μmol/mL）	100	10	10	10	1.6	0.8	0.4
标准液体积（μL）	100	100	100	80	200	200	200
蒸馏水体积（μL）	900	300	400	420	200	200	200
稀释后浓度（μmol/mL）	10	2.5	2.0	1.6	0.8	0.4	0.2

③在离心管中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
待测样本	10	10	-	-
标准稀释液	-	-	10	-
蒸馏水	-	10	-	10
试剂一	40	40	40	40
试剂二	10	-	10	10
试剂三	20	20	20	20
充分混匀，37°C避光准确反应 20 min				
试剂四	10	10	10	10
试剂五	30	30	30	30
试剂六	30	30	30	30
充分混匀，室温避光准确反应 20 min				
试剂七	200	200	200	200
充分混匀，室温静置 5 min				
15000 g 常温离心 15 min，弃上清液，留沉淀				
试剂八	220	220	220	220
充分振荡混匀，使沉淀完全溶解				

吸光值测定：吸取 200 μL 反应液至 96 孔板中，测定 570 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样品均需设一个对照管，各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 2.5、2.0、1.6、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. L-乳酸 (L-LA) 含量计算

①按组织蛋白含量计算

$$\text{L-乳酸含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x \times (V_{\text{上清液}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{\text{Cpr} \times W \times V_{\text{上清液}}} = \frac{1.1875 \times x}{\text{Cpr} \times W}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{L-乳酸含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times (V_{\text{上清液}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{W \times V_{\text{上清液}}} = \frac{1.1875 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{L-乳酸含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times (V_{\text{上清液}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{上清液}}} = \frac{1.1875 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{L-乳酸含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{x \times (V_{\text{上清液}} + V_{\text{提 B}}) \times (V_{\text{液}} + V_{\text{提 A}})}{V_{\text{液}} \times V_{\text{上清液}}} = 13.0625 \times x$$

注释： V 提 A：提取过程中加入提取液 A 的体积，1 mL；V 上清液：提取过程中吸取上清液的体积，0.8 mL；V 提 B：提取过程中加入提取液 B 的体积，0.15 mL；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白含量，mg/g；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可。

四、注意事项

①若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本使用蒸馏水适当稀释后再进行测定；低于最低值建议制备更高浓度样本后再进行测定，计算时相应修改；

②试剂三、试剂五和试剂六配制后有效期较短，为便于试验安排，均附赠一瓶作为备用，每瓶均可完成至少 50 个样本的检测；

③提取液中含有蛋白沉淀组分，待测样本不能用于蛋白含量测定，若使用蛋白浓度计算 L-乳酸含量，则需要另取样本使用 PBS 或生理盐水按照相同步骤制备为待测样本，再进行蛋白浓度测定；

④实验过程中弃上清液时应避免吸入沉淀物而影响结果的准确性；

⑤准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若样本较多可分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

⑥反应体系中试剂不能按比例配制为混合液使用，必须按反应体系顺序依次加入；

⑦为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

