

乳酸含量 (LA) 检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1258

产品规格: 50管/24样

产品简介:

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。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⁺,H⁺传递给PMS生成的PMSH₂还原MTT生成紫色物质,在570nm处有特征吸收峰。

技术指标:

最低检出限: 0.0387 μ mol/mL

线性范围: 0.039-1 μ mol/mL

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体30mL×1瓶	4°C
提取液二	液体4mL×1瓶	4°C
试剂一	液体20mL×1瓶	4°C
试剂二	液体60 μ L×1瓶	4°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C
试剂四	粉剂×1瓶	4°C
试剂五	粉剂×1瓶	-20°C
试剂六	液体5mL×1瓶	4°C
标准品	粉剂×1支	4°C

溶液的配制:

1. 试剂二: 液体置于试剂瓶内EP管中。临用前按试剂二 (V): 蒸馏水 (V) =10 μ L: 450 μ L的比例配制试剂二溶液, 现用现配;
2. 试剂三: 临用前加入12mL蒸馏水, 水浴70°C左右充分溶解, 可分装后-20°C保存, 避免反复冻融, -20°C保存一周;
3. 试剂四: 临用前加12mL蒸馏水充分溶解, 4°C保存一周;
4. 试剂五: 临用前每瓶加入8mL蒸馏水混匀, 可分装后-20°C保存, 避免反复冻融, -20°C保存一周;
5. 标准品: 临用前加入1.04mL蒸馏水配成100 μ mol/mL的标准溶液;
6. 显色液的配制: 临用前根据用量按照试剂三 (V): 试剂四 (V) =1: 1的比例充分混匀, 现配现用。

需自备的仪器和用品:

天平、研钵/匀浆器、离心机、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、恒温水浴锅、乙醇和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 组织: 按照质量 (g): 提取液一体积 (mL) 为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g, 加入1mL提取液一) 加入提取液一, 冰浴匀浆后于4°C, 12000g离心10min, 取0.8mL上清液, 再加入0.15mL提取液二, 4°C12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞: 按照细胞数量 (10⁴个): 提取液一体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细胞加入1mL提取液一), 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0.8mL上清液, 再加入0.15mL提取液二, 4°C12000g离心10min后取上清待测。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

3. 血清(浆): 取100 μ L血清(浆)加入1mL提取液一, 4 $^{\circ}$ C, 12000g离心10min, 取0.8mL上清液, 再加入0.15mL提取液二, 12000g离心10min后取上清待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上, 波长调至570nm, 乙醇调零。
2. 标准液的稀释: 将100 μ mol/mL的标准溶液用蒸馏水稀释为1、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039 μ mol/mL的标准溶液待测。
3. 加样表:

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (μ L)	50	50	-	-
标准品 (μ L)	-	-	50	-
蒸馏水 (μ L)	-	10	-	50
试剂一 (μ L)	200	200	200	200
试剂二 (μ L)	50	-	50	50
试剂五 (μ L)	100	100	100	100
在 EP 管中充分混匀, 于 37 $^{\circ}$ C水浴准确反应 20min。				
试剂六 (μ L)	30	30	30	30
显色液 (μ L)	300	300	300	300
37 $^{\circ}$ C避光反应 20min 后于 25 $^{\circ}$ C, 10000rpm 离心 10min, 去上清, 留沉淀。				
乙醇 (μ L)	1000	1000	1000	1000
充分溶解沉淀后, 于 570nm 处测定吸光值, 分别记为 A 测定管, A 对照管, A 标准管, A 空白管, 计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管; ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。				

三、乳酸含量的计算

1. 标准曲线的绘制

以各标准溶液浓度为 x 轴, 以其对应的吸光值 (ΔA 标准) 为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中得到 x (μ mol/mL)。

2. 乳酸含量计算

(1) 按照蛋白含量计算

$$\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) = x \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.1875 \times x \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (5 \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 0.2375 \times x$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] = 13.0625 \times x$$

V 样本: 加入的样本体积, 0.05mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; V 上清: 提取时上清液体积, 0.8mL; V 提取液二: 加入的提取液二体积, 0.15mL; V 提取液一: 加入的提取液一体积, 1mL; 5: 细胞数量, 5×10^6 个; V 液体: 液体样本体积, 0.1mL。

注意事项:

如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com