

乳酸（LD）测试盒说明书

（测血清、组织等）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

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：（50 管/48 样）

- 试剂一：**酶稀释液 60mL×1 瓶, 2℃~8℃可保存 6 个月。
- 试剂二：**酶贮备液 0.6 mL×1 支, 2℃~8℃可保存 6 个月。
- 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℃~8℃保存 24 小时内有效。
- 试剂三：**黄色透明液体 6 mL×2 瓶, 2℃~8℃避光可保存 6 个月。
- 试剂四：**粉剂×2 支, 短期（1 个月内）使用可放 4℃~8℃冰箱, 长期存放请置-20℃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 瓶试剂三, 转移 1mL 进入一支试剂四粉剂中, 反复颠倒离心管混匀,待粉剂溶解后, 再用微量移液器将离心管中的液体转移到瓶中, 再从这瓶试剂三中移出 1mL 到原试剂四离心管中, 如此反复 2~3 次, 使二者充分混合溶解, 配成显色剂, 2℃~8℃避光保存 2 周内有效。
- 试剂五：**终止液, 60 mL×2 瓶, 2℃~8℃可保存 6 个月。
- 试剂六：**3mmol/L 标准品, 2mL×1 支, 2℃~8℃可保存 6 个月。

三、操作步骤：

	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℃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, 测各管吸光值 A			

四、计算公式：

1、液体样本(如血清、血浆)中乳酸的计算公式：

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

2、组织(或细胞)中乳酸的计算公式：

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

C_{标准}:标准品浓度, 3mmol/L;
N:样本测试前稀释倍数;
Cpr:组织匀浆蛋白浓度,gprot/L(prot 指蛋白)。

五、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、在批量实验前需要进行预实验, 以确定测定绝对 OD(测定 OD 值-空白 OD 值)在 0.05~0.35 之间。如果测定绝对 OD 小于 0.05, 则需要加大样本浓度重新测定; 如果测定绝对 OD 大于 0.35, 则需要将样本稀释后重新测定。
- 4、本试剂盒也可用酶标仪读数: 波长 530nm, 取反应液

250μL, 酶标仪读数即可。

六、测定意义及范围：

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。

七、所需仪器设备：

- 1、721 或 722 等可见光分光光度计（有对应波长的酶标仪或半自动生化分析仪）
- 2、37℃恒温水浴箱或气浴箱
- 3、漩涡混匀器
- 4、微量移液器

附录 I： 血清（浆）、培养液中的 LD 测定

一、前处理：

取血清（浆）、培养液用生理盐水稀释成不同浓度, 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, 则需要加大样本浓度重新测定; 如果测定绝对 OD 大于 0.35, 则需要将样本稀释后重新测定）。

二、操作步骤：

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水（mL）	0.02		
3mmol/L 标准品（mL）		0.02	
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℃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, 测各管吸光值 A			

三、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：

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

附录 II：组织中的 LD 测定

一、样本前处理：

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，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液（**10%匀浆上清液**）进行测定。取 **10%匀浆上清液**用生理盐水稀释成不同浓度，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，则需要加大样本浓度重新测定；如果测定绝对 OD 大于 0.35，则需要将样本稀释后重新测定）。

[注]：对于细胞样本前处理详见《实验方法学》或我公司官网“技术文章”

二、操作步骤：

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水（mL）	0.02		
3mmol/L 标准品（mL）		0.02	
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℃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，测各管吸光值 A			

三、计算举例：

例 1：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：

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

例 2：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：

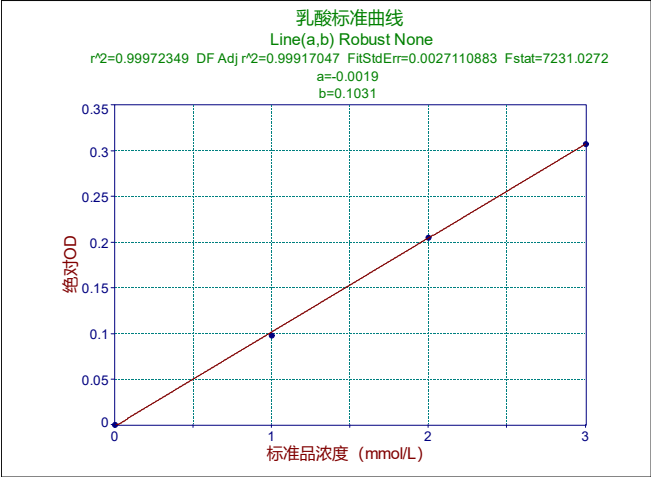
猪肌肉中乳酸含量 = $\frac{0.154 - 0.076}{0.384 - 0.076} \times 3 \div 1.019$
(mmol/gprot)
= 0.746mmol/gprot

	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℃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画，对计算结果无影响。如有需要，可另购高浓度标准品。

附录III：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：