

乳酸含量(lacticacid, LA) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10002W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 0.1-7mmol/L

灵敏度: 0.1mmol/L

有效期: 6 个月

保存温度: -20℃

检测原理:

L-乳酸在乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸，并使 NAD^+ 还原生成 NADH ；为了使该反应顺利进行另添加酶进一步分解丙酮酸；生成 NADH 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的有色物质，通过检测该物质在 450nm 的增加量，进而计算出 L-乳酸含量。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
试剂一	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶	-20℃
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃
试剂三	1mL×1 瓶	2mL×1 瓶	-20℃，避光
试剂四	100 μ L×1 瓶	100 μ L×2 瓶	-20℃
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择2-3个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.1-7mmol/L，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为试剂一。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**：按照样本质量(g)：体积(mL)为 1:10 的比例加入匀浆介质(建议取 0.1g 组织样本，加入 1mL 试剂一)进行机械匀浆。4° C，10000 g 离心 10min，取上清待测，如果需要检测蛋白浓度，可留取部分上清进行蛋白浓度测定。
4. **细菌/细胞样本**：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；照细菌/细胞数量 (10^4)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例(建议取 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一)；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；10000 g，4° C 离心 10min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。
5. **血清（浆）等液体样本**：直接测定，混浊可离心后取上清测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，试剂四冰上待用，其余组分平衡至室温。
2. **试剂二配制：**使用前取一瓶加 1.8mL 蒸馏水溶解，若不溶解可水浴加热 37℃ 溶解。临用前配制，-20℃ 避光可保存 7 天。
3. **试剂四配制：**使用前取一瓶试剂四，甩几下使试剂落入管底，加 0.5mL 蒸馏水混合均匀，避免反复冻融。
4. **反应工作液配制：**反应工作液配制：将上述溶解好的试剂，按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=13：3：1：1 的体积比混匀，实验前按需现配现用，避光保存。
5. **标准品配制：**取一瓶标准品粉剂用 1mL 的蒸馏水充分溶解，混合均匀，为 100mmol/L 标准品母液，临用前配制。溶解好的标准品稀释 10 倍，即取 100mmol/L 的母液 200 μL 加蒸馏水 1800 μL 混合均匀，浓度为 10mmol/L，然后按照下表稀释成不同浓度的标准品：0、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、0.9、1mmol/L（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	0.9	1
10mmol/L 标准品(μL)	0	10	20	30	50	70	90	100
试剂一(μL)	1000	990	980	970	950	930	910	900

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用试剂一稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2. 样本测定（在 96 孔板中依次加入）：

试剂名称(μ L)	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品	20	
样本		20
反应工作液	180	180
混匀，37℃孵育 30min 后，酶标仪 450nm 波长下检测各孔吸光度。		

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$ 。

2. 按样本鲜重计算：

$$\text{乳酸含量}(\text{mmoL/kg 鲜重})=(\Delta A-b)\div a\times N\div (W\div V)$$

3. 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{乳酸含量}(\text{mmoL/gprot})=(\Delta A-b)\div a\times N\div \text{Cpr}$$

4. 按照液体体积计算：

$$\text{乳酸含量}(\text{mmoL/L})=(\Delta A-b)\div a\times N$$

5. 按细菌/细胞数量计算：

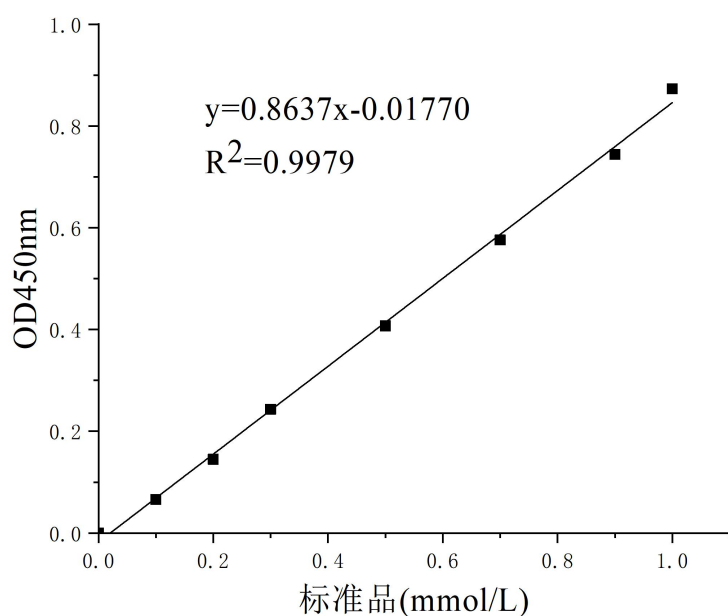
$$\text{乳酸含量}(\text{mmoL}/10^4 \text{ cell})=(\Delta A-b)\div a\times N\div (500\div V)$$

注：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值（标准品浓度为 0 时的 OD 值）	ΔA : 样本的 OD 值 - 空白 OD 值（准品浓度为 0 时的 OD 值）
a: 标准曲线斜率	V: 匀浆加入试剂一的体积，mL
x: 标准品的浓度	W: 样本鲜重，g
b: 标准曲线截距	500: 细胞数目，万
N: 样本的稀释倍数	Cpr: 待测样本的蛋白浓度，gprot/L

参考曲线:

$y=0.8637x-0.01770$, $R^2=0.9979$, x 是标准品的浓度 (mmol/L), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。