CheKine™ 乳酸含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1100　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　96 T×5/480 S　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**0.03 - 2 mM		**灵敏度：**0.03 mM
	适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）或其他液体		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

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和有氧代谢的重要指标。异常高浓度的乳酸与癌症、糖尿病和乳酸酸中毒等病理状况有关。

本试剂盒检测原理是乳酸脱氢酶催化 L-乳酸生成丙酮酸，同时使 NAD^+还原成 NADH 和 H^+，进一步通过 1-mPMS 的递氢作用与 WST-8 反应形成黄色可溶性甲臜，测定其在 450 nm 处的吸光度值即可计算样本中 L-乳酸的含量。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存要求
	48 T	96 T	96 T×5	
Lactate Assay Buffer	85 mL	85 mL×2	85 mL×10	4℃
Lactate Dehydrogenase	0.7 mL	1.4 mL	1.4 mL×5	-20℃
Lactate Dehydrogenase Cofactor	0.5 mL	1 mL	1 mL×5	-20℃
WST-8	700 µL	1.4 mL	1.4 mL×5	-20℃，避光保存
Enhancer	140 µL	280 µL	280 µL×5	-20℃，避光保存
L(+)-Lactate Standard (100 mM)	50 µL	100 µL	100 µL×5	-20℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS（pH 7.4）	清洗样本用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、制冰机、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Lactate Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Lactate Dehydrogenase	即用型；	实验过程中，冰上放置；分装保存于-20℃。
Lactate Dehydrogenase Cofactor	即用型；	实验过程中冰上放置；分装保存于-20℃。
WST-8	即用型；	实验过程中冰上放置；分装保存于-20℃。
Enhancer	即用型；	实验过程中冰上避光放置；分装避光保存于-20℃，避免反复冻融，Enhancer 正常为玫瑰红色溶液，如遇发黄，请与 Abbkine 工作人员联系。
L(+)-Lactate Standard (100 mM)	使用前平衡到室温	100mM，分装保存于-20℃

05-1-2 标准品配制

取 20 μL 100mM 的标准品加入 980 μL Lactate Assay Buffer 中，配制为 2mM 的标准品储备液，分装于-20℃保存 1 个月。使用 Lactate Assay Buffer 将 2mM 标准品储备液依次稀释至终浓度为 1mM、0.5mM、0.25mM、0.125mM、0.0625mM、0.03125mM 的 Standard，以 Lactate Assay Buffer 作为空白孔。

序号	Standard（μL）	Lactate Assay Buffer（μL）	浓度（mM）
1	200 μL 2mM	0	2
2	200 μL 2mM	200	1
3	200 μL 1mM	200	0.5
4	200 μL 0.5mM	200	0.25
5	200 μL 0.25mM	200	0.125
6	200 μL 0.125mM	200	0.0625
7	200 μL 0.0625mM	200	0.03125
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。细胞或组织提取物中的 NADH 或 NADPH 会产生乳酸测定的背景，为了去除 NADH 或 NADPH 背景，同样数量的样品可以在没有乳酸脱氢酶的情况下进行检测，然后从乳酸读数中减去背景读数。内源性乳酸脱氢酶（LDH）可降解乳酸。含有 LDH（如细胞培养液、细胞或组织裂解液等）的样品应通过 10 kDa MW 超滤管（12000 g，4℃离心 10 min，具体过滤步骤以说明书为准），以去除所有蛋白质，取滤液进行检测，然后-80℃保存。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 组织样本，加入 1 mL Lactate Assay Buffer，冰浴匀浆，12000 g，4℃离心 5 min，取上清液于新离心管中，置冰上待检测。
- **细胞或细菌样本**：收集 5×10^6 个细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min 后弃上清，加入 1 mL Lactate Assay Buffer，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 12000 g，4℃离心 5 min，取上清液，置冰上待测。
- **血浆和血清（其他生物体液）**：直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。

Working Reagent 的配制：每孔需要 250 μL Working Reagent，为避免损失，按 260 μL 每单孔体系配制：吸取 230 μL Lactate Assay Buffer、8 μL Lactate Dehydrogenase Cofactor、10 μL WST-8、2 μL Enhancer 和 10 μL Lactate Dehydrogenase，混合均匀。Working Reagent 需现配现用。

2. **检测体系配制**：按如下体系在酶标板中进行检测体系配制。标准曲线一般只做 1 次。

试剂	空白孔（μL）	标准孔（μL）	测定孔（μL）
样本	0	0	10
Standard	0	10	0
Lactate Assay Buffer	10	0	0
Working Reagent	250	250	250

3. **吸光度检测：**混匀后，37℃避光孵育 30 min。在 450 nm 处读取吸光度值，分别记为 $A_{空白}$、$A_{标准}$和 $A_{测定}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]>进入“**技术中心**”>查找“**在线计算器**”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$，$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值(mM)。

3. 样本 L-乳酸含量计算

- 按样本质量计算

L-乳酸（μmol/g）=$y\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n=$**$y\div W\times n$**

- 按细胞或细菌数量计算:

L-乳酸（μmol/10^4）=$y\times V_{样}\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\times n=$**$y\div N\times n$**

- 按液体体积计算

L-乳酸（mM）=$y\times V_{样}\div V_{样}\times n=$**$y\times n$**

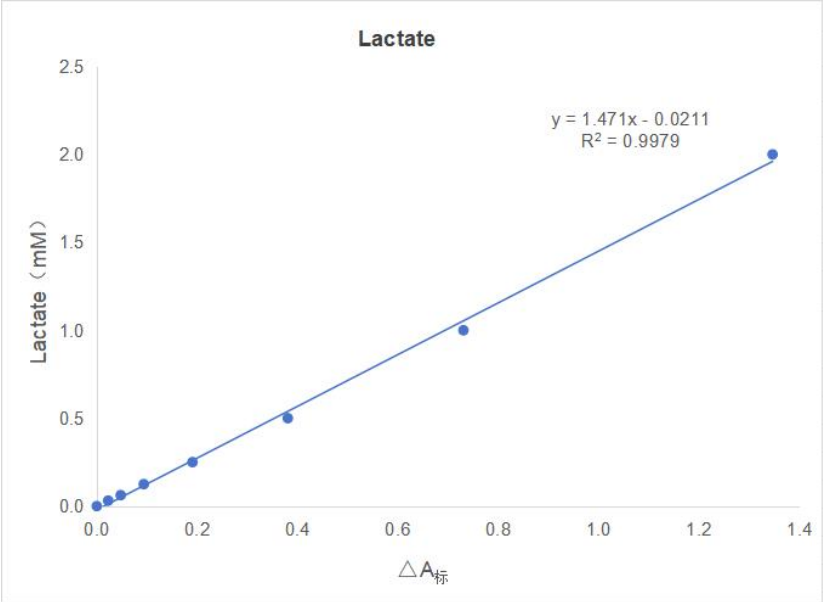
- 按蛋白浓度数量计算

L-乳酸（μmol/ mg prot）=$y\times V_{样}\div(V_{样}\times Cpr)\times n=$**$y\div Cpr\times n$**

1 mM=1 μmol/mL；$V_{样}$：加入样本体积，0.01 mL；n：样品稀释倍数；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；$V_{样总}$：样本提取体积，1 mL；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

典型标准曲线：y=1.471x-0.0211，R^2=0.9979



示例-1：取 10 μL 鸡血清，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$=0.435-0.096=0.339，代入标准曲线，计算 y=0.478。按液体体积计算得：L-乳酸含量 (mM)=y×$V_{样}$÷$V_{样}$×n=**y×n**=0.478×1=0.478mM。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果样本的$\Delta A_{测定}$高于 2 mM 标准品的$\Delta A_{标准}$值，则说明样本乳酸含量太高，需用 Lactate Assay Buffer 适当稀释（计算公式中乘以相应稀释倍数）。如果样本的$\Delta A_{测定}$ < 0.10，可提高样本量。

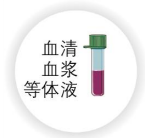
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1110	CheKine™ 乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1230	CheKine™ 琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 乳酸含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1100）

样本处理



根据实际需求对样本
稀释或不稀释



1 mL Lactate Assay Buffer
冰浴匀浆





收集清洗的细胞或细菌
1 mL Lactate Assay Buffer
冰浴超声破碎5 min（功率
20%或200 W，超声3 s，间
隔7 s，重复30次）



12000 g，4℃离心5 min，取上清



体系配置

Working Rregent 按260 μL / 孔进行配制

Lactate Assay Buffer	230 μL
Lactate Dehydrogenase Cofactor	8μL
WST-8	10μL
Enhancer	2μL
Lactate Dehydrogenase	10μL

标准品配制



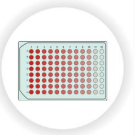




样本	10 μL	Lactate Assay Buffer	10μL	Standard	10 μL
Working Reagent	250 μL	Working Reagent	250 μL	Working Reagent	250 μL

混匀，37℃避光孵育30 min

数据检测



测定450 nm吸光度
结果计算

V1.0