

D-乳酸 (D-LA) 含量检测试剂盒 (WST 显色法) 说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC5350

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

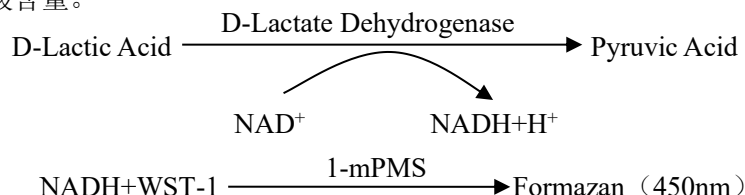
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	液体 12 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一支加入 160 μ L 蒸馏水溶解。2-8°C 可以保存 4 周（该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
- 2、试剂二工作液的配制：临用前按试剂二（V）：蒸馏水（V）=10 μ L：90 μ L（1T）的比例配制，现用现配，用多少配多少；
- 3、试剂三：临用前加入 15 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20°C保存，避免反复冻融，-20°C保存 4 周；
- 4、标准品：1000 μ mol/mL D-乳酸标准液。临用前取 20 μ L 1000 μ mol/mL D-乳酸标准液和 1980 μ L 蒸馏水混合配成 10 μ mol/mL 标准溶液；再吸取 20 μ L 10 μ mol/mL 标准溶液和 620 μ L 蒸馏水混合配成 0.3125 μ mol/mL 标准溶液备用。

产品说明：

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。D-乳酸在D-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⁺，在1-mPMS作用下，WST-1可与NADH反应，产生水溶性formazan，其在450nm处有最大吸收峰，据此可计算D-乳酸含量。



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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、分析天平、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、离心机、1mL玻璃比色皿、水浴锅/恒温培养箱、蒸馏水和冰。

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，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C 12000g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，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C 12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取100μL液体加入1mL提取液一，4°C 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，12000g离心10min后取上清待测。

注：试剂二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，波长调至450nm，蒸馏水调零。

2、加样表：（按顺序将下列试剂加在EP管中）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100	-	-
标准溶液	-	-	100	-
蒸馏水	-	100	-	100
试剂一	450	450	450	450
试剂二工作液	100	-	100	100
试剂三	200	200	200	200
试剂四	150	150	150	150

充分混匀，于37°C水浴锅/恒温培养箱避光准确反应30min，取全部反应液到1mL比色皿中，于450nm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。每个测定管需设置一个对照管，空白管和标准管只需测定1-2次。

三、D-乳酸含量的计算

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{D-LA含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{D-LA含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \\ &= 0.3711 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{D-LA含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell})$$

$$= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}})$$

$$= 0.3711 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

4. 按照液体体积计算

D-LA含量 ($\mu\text{mol/mL}$)

$$= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})]$$
$$= 4.082 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标准：标准溶液浓度， $0.3125\mu\text{mol/mL}$ ；V样本：加入的样本体积， 0.1mL ；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 ；N：细胞数量，以 10^6 计；V液体：液体样本体积， 0.1mL 。

注意事项：

1. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量，需另取组织。

2. ΔA 测定的测定范围在0.01-1.2之间。如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以用蒸馏水稀释样本后再次测定，如果测定吸光值小于线性范围吸光值，需要增加样本量后再次测定，注意同步计算公式。

实验实例：

1、取 0.104g 兔肌肉加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆后离心，取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清后按照测定步骤操作，使用比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.637 - 0.308 = 0.329$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.636 - 0.124 = 0.512$ ，按照样本质量计算含量得：

$$\text{D-LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.3711 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 2.2929 \mu\text{mol/g 质量}。$$

2、取 $100\mu\text{L}$ 牛血清加入 1mL 提取液一，离心，取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清，之后按照测定步骤操作，使用比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.356 - 0.302 = 0.054$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.636 - 0.124 = 0.512$ ，按照液体体积计算含量得：

$$\text{D-LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = 4.082 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.4305 \mu\text{mol/mL}。$$

相关系列产品：

BC0740/BC0745 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒

BC0540/BC0545 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒

BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒

BC5280/BC5285 D-乳酸脱氢酶 (D-LDH) 活性检测试剂盒

BC0680/BC0685 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒

BC5340/BC5345 L-乳酸含量 (L-LA) 检测试剂盒 (WST显色法)