

L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒 (WST 显色法) 说明书

微量法

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：BC5345

规格：100T/48S

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。

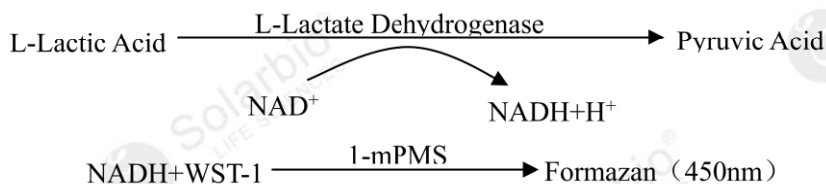
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前按试剂二 (V)：蒸馏水 (V) = 10μL：450μL (46T) 的比例配制试剂二溶液，现用现配；
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、标准品：临用前加入 1.04 mL 蒸馏水配成 100 μmol/mL 的标准溶液，2-8℃可保存 12 周；

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。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⁺，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：

分析天平、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、水浴锅/恒温培养箱、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℃，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℃ 12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞或细菌：按照细胞/细菌数量（10⁴个）：提取液一（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞/细菌加入1mL提取液一），冰浴超声波破碎细胞/细菌（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；于4℃，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℃ 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℃ 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℃ 12000g离心10min后取上清待测。

注：提取液二需缓慢加入，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/酶标仪预热30min以上，波长调至450nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：将100μmol/mL的标准溶液用蒸馏水稀释为1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.020μmol/mL的标准溶液备用。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	100	50	950	5
2	5	250	750	1.25
3	1.25	500	500	0.625
4	0.625	200	200	0.3125
5	0.3125	200	200	0.15625
6	0.15625	200	200	0.078
7	0.078	200	200	0.039
8	0.039	200	200	0.020

备注：下述实验中每个标准管需 10μL 标准溶液（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

3、加样表：（按顺序将下列试剂加在96孔板/EP管中）

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（μL）	10	10	-	-
标准品（μL）	-	-	10	-
蒸馏水（μL）	-	10	-	10
试剂一（μL）	40	40	40	40
试剂二（μL）	10	-	10	10
试剂三（μL）	20	20	20	20
试剂四（μL）	30	30	30	30
充分混匀，于 37℃水浴锅/恒温培养箱准确避光反应 30min。				
蒸馏水（μL）	90	90	90	90



混匀后, 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, 空白管和标准曲线只需测定 1-2 次。

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 ($\mu\text{mol/mL}$)。

2、乳酸含量计算

(1) 按照样本蛋白浓度计算

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

(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/细菌数量计算

$$\text{LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.1875 \times x \div N$$

(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, 0.01mL; 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: 加入提取液二的体积, 0.15mL; V 提取液一: 加入的提取液一, 1mL; N: 细胞/细菌数量, 10^4 个; V 液体: 液体样本体积, 0.1mL。

注意事项:

1. ΔA 测定的测定范围在0.01-1.1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。
2. 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。

实验实例:

- 1、取 0.1466g 小鼠肝加入 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, 离心取上清后用蒸馏水稀释两倍, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.573-0.091=0.482, 根据标准曲线 $y=0.8941x+0.0016$, $R^2=0.9991$, 计算 $x=0.5373$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = 1.1875 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 1.1875 \times 0.5373 \div 0.1466 \times 2 = 8.7046 \mu\text{mol/g 质量}。$
- 2、取 0.1063g 红薯根加入 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, 之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.128-0.105=0.023, 根据标准曲线 $y=0.8941x+0.0016$, $R^2=0.9991$, 计算 $x=0.0239$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = 1.1875 \times x \div W = 1.1875 \times 0.0239 \div 0.1063 = 0.2674 \mu\text{mol/g 质量}。$
- 3、取 100 μL 羊血清加入 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 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.424-0.104=0.320, 根据标准曲线 $y=0.8941x+0.0016$, $R^2=0.9991$, 计算 $x=0.3561$, 按照液体体积计算含量得:
 $\text{LA 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = 13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.3561 = 4.6517 \mu\text{mol/mL}。$





相关发表文献:

- [1] Zhang Y, Sheng Z, Su C, Xia Y, Chen X, Huang X, Li H, Ma C, Wang L. Caudatin Inhibits the Proliferation, Invasion, and Glycolysis of Osteosarcoma Cells via the Wnt/ β -Catenin Pathway. Evid Based Complement Alternat Med. 2022 Dec 23;2022:4026688. doi: 10.1155/2022/4026688. PMID: 36588592; PMCID: PMC9803569.

参考文献:

- [1] Eolbergrová J, MacMillan V, Siesjö B K. The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/NAD⁺ ratio of the rat brain[J]. Journal of neurochemistry, 1972, 19(11): 2497-2505.

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

