

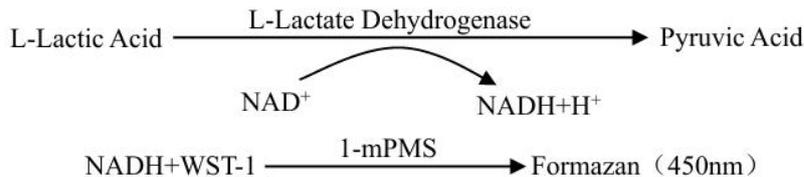
L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒 (WST显色法) (微量法)

产品货号: BA2075

产品规格: 100T/48S

产品简介:

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。

产品组成:

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

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: 临用前加入3mL蒸馏水混匀, 可分装后-20°C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100μmol/mL的标准溶液, 2-8°C可保存12周。

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 (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);



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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。

- 血清(浆)等液体: 取 100 μ L 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: 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

- 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 波长调至 570nm, 分光光度计用乙醇调零。
- 标准液的稀释: 将 100 μ mol/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、0.020 μ mol/mL 的标准溶液待测。
- 标准品稀释表:

序号	稀释前浓度(μ mol/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 μ mol/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

实验中每个标准管需 10 μ L 标准溶液。

- 加样表:

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

- 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 (μ mol/mL)。

- 乳酸含量计算

- (1) 按照样本蛋白浓度计算

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

- (2) 按照样本质量计算

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.1875 \times x \div W$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times (\text{V 上清} + \text{V 提取液二}) \div (\text{N} \times \text{V 上清} \div \text{V 提取液一}) = 1.1875 \times x \div \text{N}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{L-LA 含量 } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = x \times (\text{V 上清} + \text{V 提取液二}) \div [\text{V 液体} \times \text{V 上清} \div (\text{V 提取液一} + \text{V 液体})] = 13.0625 \times x$$

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: 加入的提取液一体积, 1mL; N: 细胞数量, 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 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com