

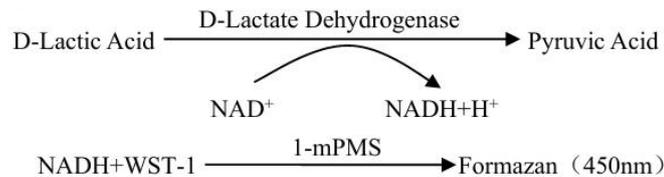
## D-乳酸（D-LA）含量检测试剂盒（WST显色法）（微量法）

产品货号：BA2073

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。D-乳酸在D-乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸，同时使NAD<sup>+</sup>还原生成NADH和H<sup>+</sup>，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。

### 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℃
提取液二	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	液体4mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	-20℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取一支加入160μL蒸馏水溶解。2-8℃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）=10μL：90μL（5T）的比例配制，现用现配，用多少配多少；
3. 试剂三：临用前加入5mL蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存，避免反复冻融，-20℃保存4周；
4. 标准品：1000μmol/mL D-乳酸标准液。临用前取20μL 1000μmol/mL D-乳酸标准液和1980μL蒸馏水混合配成10μmol/mL标准溶液；再吸取20μL 10μmol/mL 标准溶液和620μL蒸馏水混合配成0.3125μmol/mL标准溶液备用。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、分析天平、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、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）：



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

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（10<sup>4</sup> 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，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. 加样表：（按顺序将下列试剂加在 96 孔板/EP 管中）：
3. 加样表：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	20	20	-	-
标准溶液	-	-	20	-
蒸馏水	-	20	-	20
试剂一	90	90	90	90
试剂二工作液	20	-	20	20
试剂三	40	40	40	40
试剂四	30	30	30	30

充分混匀，于 37℃ 水浴锅/恒温培养箱避光准确反应 30min，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  $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ； $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。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、D-乳酸含量的计算

- (1) 按照样本蛋白浓度计算

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

- (2) 按照样本质量计算

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

- (3) 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{D-LA 含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) &= \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times (V_{上清} + V_{提取液二}) \div (N \times V_{上清} \div V_{提取液一}) \\ &= 0.3711 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div N \end{aligned}$$

- (4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{D-LA 含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) &= \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times (V_{上清} + V_{提取液二}) \div [V_{液体} \times V_{上清} \div (V_{提取液一} + V_{液体})] \\ &= 4.082 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \end{aligned}$$

C 标准：标准溶液浓度，0.3125μmol/mL；V 样本：加入的样本体积，0.1mL；W：样本质量，g；C<sub>pr</sub>：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



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

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.  $\Delta A$  测定的测定范围在 0.01-1 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。



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