

# 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。**

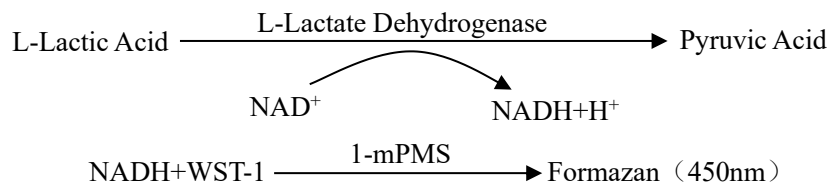
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

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°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 100 μmol/mL 的标准溶液，2-8°C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<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（10<sup>4</sup>个）：提取液一体积（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：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/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

实验中每个标准管需 10μL 标准溶液

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  $\Delta A$  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、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（ $\Delta A$ 标准）为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将  $\Delta A$ 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：加入的提取液一体积，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.  $\Delta A$ 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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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 $\mu\text{L}$  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  $\Delta A$  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：

$$\text{LA 含量} (\mu\text{mol/mL}) = 13.0625 \times x = 13.0625 \times 0.3561 = 4.6517 \mu\text{mol/mL}。$$

#### 参考文献：

Eolbergrová J, MacMillan V, Siesjö B K. The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/NAD<sup>+</sup> 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