

D-乳酸(D-LA)含量检测试剂盒(WST 显色法)

中文名称：D-乳酸(D-LA)含量检测试剂盒

英文名称：D-Lactic acid(D-LA)Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

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℃保存
提取液二	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃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	液体 1mL×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

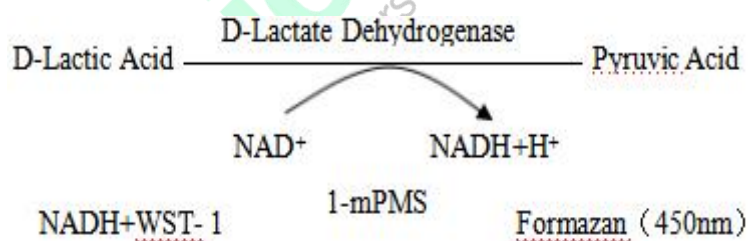
- 1、试剂二：临用前取一支加入 160μL 蒸馏水溶解。2-8℃可以保存 4 周(该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同)；
- 2、试剂二工作液的配制：临用前按试剂二 (V)：蒸馏水 (V) =10μL：90μL (1T)的比例

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℃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。

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⁺ 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、1m 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)

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：按照细胞数量 (10^4 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℃，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 100 μ L 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(μ L)	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，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

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

4. 按照液体体积计算

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

C 标准：标准溶液浓度，0.3125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V 样本：加入的样本体积，0.1mL；W：样本质量，g；C_{pr}：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 10⁶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 96 孔板测得计算 ΔA 测定管=A 测定-A 对照=0.321-0.179=0.142, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.405-0.122=0.283, 按样本质量计算含量得：

D-LA 含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $0.3711 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 1.7904 \mu\text{mol/g}$ 质量。

2 、取 100 μL 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 96 孔板测得计算 ΔA 测定管=A 测定-A 对照=0.221-0.169=0.052, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.405-0.122=0.283，按照液体体积计算含量得：

D-LA 含量($\mu\text{mol/mL}$)= $4.082 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} = 0.75 \mu\text{mol/mL}$ 。