

L-乳酸 (L-LA) 含量检测试剂盒 (WST显色法)

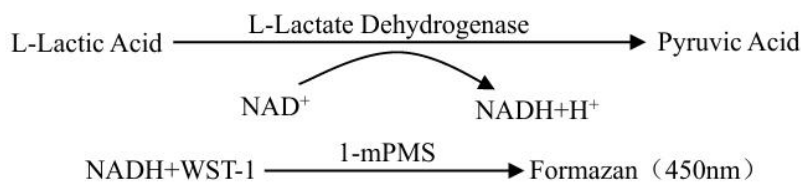
(可见分光光度法)

产品货号: BA2074

产品规格: 50T/24S

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30mL×1瓶	2-8°C
提取液二	液体5mL×1瓶	2-8°C
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体60μL×1支	2-8°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C
试剂四	液体12mL×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 (9T) 的比例配制试剂二溶液, 现用现配;
2. 试剂三: 临用前加入8mL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、1mL 玻璃比色皿、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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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（ 10^4 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. 分光光度计预热 30min 以上，波长调至 570nm，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 0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.020、0.01μmol/mL 的标准溶液待测。
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	100	700	0.625
3	0.625	200	200	0.3125
4	0.3125	200	200	0.15625
5	0.15625	200	200	0.078
6	0.078	200	200	0.039
7	0.039	200	200	0.020
8	0.020	200	200	0.010

实验中每个标准管需 50μL 标准溶液。

4. 加样表：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	50	50	-	-
标准品	-	-	50	-
蒸馏水	-	50	-	50
试剂一	200	200	200	200
试剂二	50	-	50	50
试剂三	100	100	100	100
试剂四	150	150	150	150
充分混匀，于 37℃ 水浴锅/恒温培养箱准确避光反应 30min。				
蒸馏水	450	450	450	450
混匀后，取出全部反应液到 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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ； $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。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 $\Delta A_{测定}$ 测定带入公式中得到 x（μmol/mL）。

2. 乳酸含量计算



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

(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

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

(3) 按照细胞数量计算

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

(4) 按照液体体积计算

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

V 样本：加入的样本体积，0.05mL；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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>