

D-乳酸 (D-LA) 含量检测试剂盒 (WST显色法)

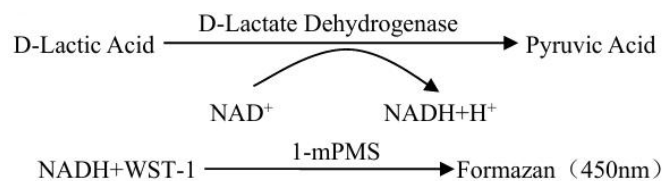
(可见分光光度法)

产品货号: BA2072

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。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。

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30mL×1瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×2支	-20°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C
试剂四	液体12mL×1瓶	2-8°C
标准品	液体1mL×1支	-20°C

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°C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15mL蒸馏水混匀,可分装后-20°C保存,避免反复冻融,-20°C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、分析天平、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、离心机、1mL 玻璃比色皿、水浴锅/恒温培养箱、蒸馏水和冰。



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

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°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 (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°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。
3. 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

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):
3. 加样表:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100	-	-
标准溶液	-	-	100	-
蒸馏水	-	100	-	100
试剂一	450	450	450	450
试剂二工作液	100	-	100	100
试剂三	200	200	200	200
试剂四	150	150	150	150

充分混匀, 于 37°C 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) 按照样本蛋白浓度计算

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

(2) 按照样本质量计算

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

(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

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



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

C 标准: 标准溶液浓度, $0.3125\mu\text{mol/mL}$; V 样本: 加入的样本体积, 0.1mL ; 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 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. 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。



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>