



D-乳酸(D-LA)含量检测试剂盒(WST 显色法)(可见分光光度法)

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：50T/24S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

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 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 12 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



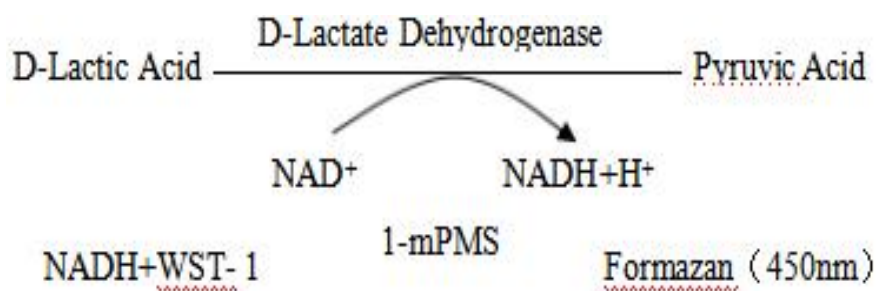
配制，现用现配，用多少配多少；

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。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

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 (10⁴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 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 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(μL)	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

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

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

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

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；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。

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，使用比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.637-0.308=0.329, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.636-0.124=0.512, 按照样本质量计算含量得：

D-LA 含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $0.3711 \times \Delta A$ 测定 \div ΔA 标准 \div W = $2.2929 \mu\text{mol/g}$ 质量。

2，取 100 μL 牛血清加入 1mL 提取液一，离心，取 0.8m 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，使用比色皿测得计算 ΔA 测定管=A 测定管-A 对照管=0.356-0.302=0.054, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.636-0.124=0.512, 按照液体体积计算含量得：

D-LA 含量($\mu\text{mol/mL}$)= $4.082 \times \Delta A$ 测定 \div ΔA 标准= $0.4305 \mu\text{mol/mL}$ 。