

概述

乳酸是细胞的一种主要代谢途径-糖酵解的代谢产物，也是肌肉疲劳和高乳酸血症的重要生物标志物。它还可以作为监测细胞内代谢途径变化的标志物。此外，最近的代谢研究表明，乳酸是组织和癌细胞的三羧酸循环中碳的主要来源¹⁾。

Lactate Assay Kit-WST®可用于定量检测糖酵解代谢产生的乳酸，并优化了定量过程。本试剂盒通过测定WST®的显色反应来定量细胞上清液中的乳酸含量，可用96孔板检测，灵敏度高，最低可检测到0.02 mmol/l的乳酸。

WST®：WST是日本同仁化学研究所的注册商标

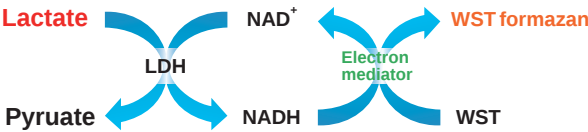


图1. 乳酸检测原理

试剂盒内含

- 50次：
- 200次：
- Dye Mixture × 1管

- Lactate Standard (10 mmol/l) 150 μl × 1管

- Enzyme Solution 12 μl × 1管

- Assay Buffer 5.5 ml × 1管

- Reconstitution Buffer 550 μl × 1管
- Dye Mixture × 1管

- Lactate Standard (10 mmol/l) 600 μl × 1管

- Enzyme Solution 48 μl × 1管

- Assay Buffer 11 ml × 2管

- Reconstitution Buffer 2.2 ml × 1管

储存条件

0-5

所需的设备
和材料

- 酶标仪 (含450 nm 滤光片)
- 96孔板
- 37 培养箱
- 20-200 μl多通道移液器
- 20 μl, 200 μl, 1,000 μl移液器

注意事项

- * 使用前请先放置本试剂盒至室温；
- * 由于酶悬浮于液体中，吸取前，请用移液器混匀Enzyme Solution；
- * 建议每个样品设定3个复孔，以提高数据准确性；
- * 由于加入工作液后，酶催化反应立即开始，建议使用多通道移液器以减少时间间隔带来的误差；
- * 请准备不同稀释比例的样品来选择合适的稀释比例，乳酸浓度范围为0-1 mmol/l；
- * Dye Mixture的包装为带铝盖的玻璃瓶，使用时请戴好手套；
- * 本试剂盒用于检测细胞上清液中的乳酸。如果要检测细胞内的乳酸浓度，请用0.1% Triton溶液裂解细胞并配制乳酸标准液。

溶液配制

配制Dye Mixture储存液

将所有Reconstitution Buffer加入Dye Mixture瓶中，盖上盖子，充分溶解。

将配制好的Dye Mixture储存液转移至Reconstitution Buffer管中，在0-5 避光保存，可保存4个月。

配制工作液

1) 将Dye Mixture储存液加入锥形管中并用Assay Buffer稀释。

2) 参考表1将Enzyme Solution加入上述溶液中。

由于工作液对光敏感，请现配现用并用铝箔纸包裹，避光保存，并在一天内用完。

	for 24 well	for 48 well	for 96 well
Dye Mixture Stock Solution	250 μl	500 μl	1 ml
Assay Buffer	2.25 ml	4.5 ml	9 ml
Enzyme Solution	5 μl	10 μl	20 μl

表1. 配制工作液的各溶液体积

1. 制备样品

制备细胞上清液样品

请用超纯水稀释，制备不同稀释比例的样品来选择合适的稀释比例，乳酸浓度范围为0-1 mmol/l。

如果培养基中含有血清，请设定含血清培养基作为空白对照，每个样品值需减去空白对照值。

每孔所需样品量为20 μ l。

2. 配制乳酸标准液

取50 μ l的10 mmol/l乳酸标准液和450 μ l超纯水混合于离心管中，配制成1 mmol/l的乳酸标准液。请

按照图2方法用超纯水稀释，配制以下系列乳酸浓度梯度的标准液：1 mmol/l, 0.5 mmol/l,

0.25 mmol/l, 0.125 mmol/l, 0.0625 mmol/l, 0.0313 mmol/l, 0.0157 mmol/l, 0 mmol/l。

* 如需检测细胞内的乳酸浓度，请用0.1%的Triton代替超纯水配制乳酸标准液。

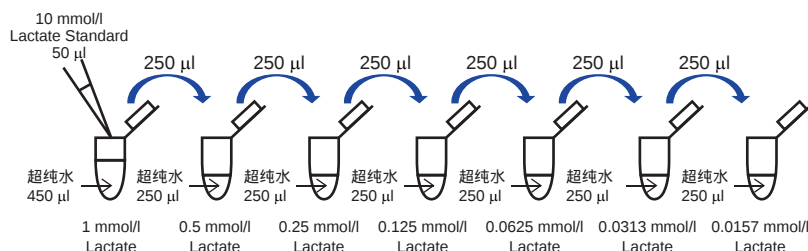


图2. 配制乳酸标准液

3. 检测

1. 按照图3在每孔中分别加入20 μ l乳酸标准液和样品溶液 (图3)。

* 建议每个样品设定3个复孔，以提高数据准确性。

2. 在每孔中加入80 μ l工作液。

* 由于加入工作液后，酶催化反应立即开始，建议使用多通道移液器以减少时间间隔带来的误差。

3. 在37 $^{\circ}$ C培养箱培养30 min。

* 为了防止溶液蒸发，请密封96孔板。

4. 用酶标仪测定450 nm的吸光度。

5. 用标准曲线计算样品的乳酸浓度。

* 如果原始样品已被稀释，请根据稀释比例计算原样品的乳酸浓度。

	1	2	3	4	5	6
A	0 mmol/l Lactate				Sample 1	
B	0.0157 mmol/l Lactate				Sample 2	
C	0.0313 mmol/l Lactate				Sample 3	
D	0.0625 mmol/l Lactate				Sample 4	
E	0.125 mmol/l Lactate				Sample 5	
F	0.25 mmol/l Lactate				Sample 6	
G	0.5 mmol/l Lactate				Sample 7	
H	1 mmol/l Lactate				Sample 8	

图3. 96孔板排列示意图

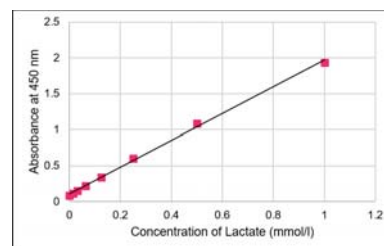


图4. 乳酸标准曲线

2-脱氧-D-葡萄糖对糖酵解的抑制作用

1. 在96孔板中接种 1×10^4 个/孔的HeLa细胞 (MEM培养基中含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素)，在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中过夜培养。

2. 去除上清液后，在培养基中加入100 μ l配制好的系列浓度的2-脱氧-D-葡萄糖溶液。

3. 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中过夜培养。

4. 培养后，吸取20 μ l细胞上清液至1.5 ml微量管中，并用超纯水稀释8倍制备样品溶液，然后按照图3在每孔中加入20 μ l样品溶液。

5. 按照“配制乳酸标准液”的方法配制乳酸标准液。

6. 在96孔板中按照图3在每孔中加入20 μ l各种浓度的乳酸标准液。

7. 在每孔中加入80 μ l工作液。

8. 在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养30 min。

9. 用酶标仪测定450 nm的吸光度，并用标准曲线计算样品的乳酸浓度。

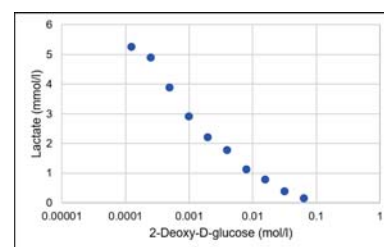


图5. 2-脱氧-D-葡萄糖对糖酵解的抑制作用
随着2-脱氧-D-葡萄糖 (一种糖酵解抑制剂) 浓度的增加，乳酸浓度逐渐减少

S.Hui, et al., Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate, *Nature*, 2017, 551, 115-118.



东仁化学科技 (上海) 有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下的方式联系我们：

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编：200030

邮编：100029

电话：400-823-9388

电话：010-8225-1765

2018年11月