

## 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<sup>1)</sup>。

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

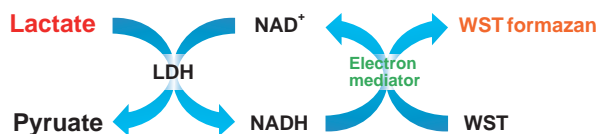


图1. 乳酸检测原理

## 试剂盒内含

50次：

- Dye Mixture ..... x 1管
- Lactate Standard (10 mmol/l) ..... 150 μl x 1管
- Enzyme Solution ..... 12 μl x 1管
- Assay Buffer ..... 5.5 ml x 1管
- Reconstitution Buffer ..... 550 μl x 1管

200次：

- Dye Mixture ..... x 1管
- Lactate Standard (10 mmol/l) ..... 600 μl x 1管
- Enzyme Solution ..... 48 μl x 1管
- Assay Buffer ..... 11 ml x 2管
- Reconstitution Buffer ..... 2.2 ml x 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 X-100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。

## 操作步骤

	24 孔板	48 孔板	96 孔板
Dye Mixture Stock Solution	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml
Assay Buffer	2.25 ml	4.5 ml	9 ml
Enzyme Solution	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l

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  $\mu$ l。

### 2.配制乳酸标准液

取50  $\mu$ l的10 mmol/l乳酸标准液和450  $\mu$ 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，配制成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 X-100代替超纯水配制乳酸标准液。

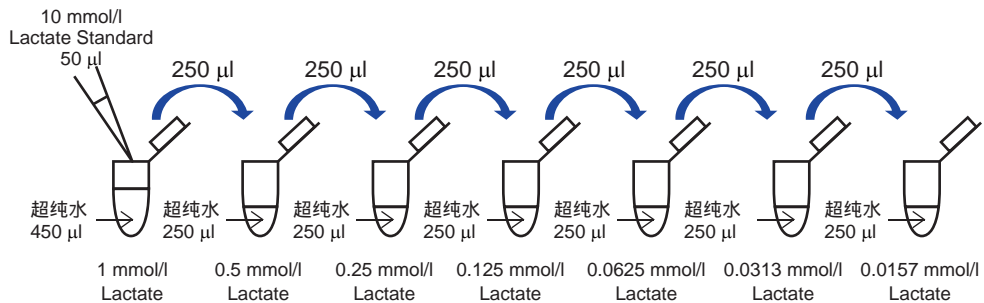


图2. 配制乳酸标准液

### 3. 检测

1. 按照图3在每孔中分别加入20  $\mu$ l乳酸标准液和样品溶液。

\* 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  $\mu$ 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

## 2-脱氧-D-葡萄糖对糖酵解的抑制作用

1. 在96孔板中接种 $1 \times 10^4$ 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 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。
2. 去除上清液后, 在培养基中加入100 μl配制好的系列浓度的2-脱氧-D-葡萄糖溶液。
3. 在37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。
4. 培养后, 吸取20 μl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 μl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 μl各种浓度的乳酸标准液。
7. 在每孔中加入80 μl工作液。
8. 在37 °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。

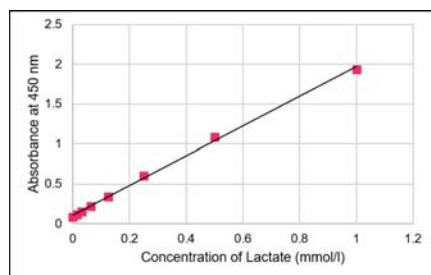


图4. 乳酸标准曲线

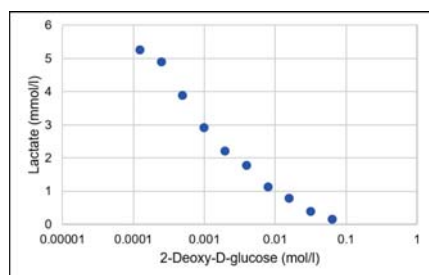


图5. 2-脱氧-D-葡萄糖对糖酵解的抑制作用  
随着2-脱氧-D-葡萄糖 (一种糖酵解抑制剂) 浓度的增加, 乳酸浓度逐渐减少

## Q&amp;A

Q: 如何检测细胞内的乳酸含量?

A: 请参考以下操作步骤:

- (1) 用微量管收集 $1 \times 10^5$ 个细胞<sup>1)</sup>。
- (2) 在300 × g离心2 min后去除上清液。
- (3) 加入300 μl冷的PBS, 用移液器使其重悬, 在300 × g再次离心2 min后去除上清液。
- (4) 加入300 μl的0.1% Triton X-100细胞裂解液<sup>2)</sup> 并涡旋1 min, 制成细胞裂解液。
- (5) 在8,000 × g离心5 min, 收集上清液。
- (6) 将步骤 (5) 所得溶液用超滤管 (Pall, No.OD010C3, 滤膜分子量: 10K)<sup>3)</sup> 去除蛋白质, 得到待测样品。

<sup>1)</sup> 样品为HeLa细胞时, 为了检测出0.02 mmol/l以上的乳酸含量, 需要 $1 \times 10^6$ 的细胞数量甚至更多。

<sup>2)</sup> 若细胞裂解液中含有SDS会抑制显色, 因此请避免使用含有SDS的缓冲液。

<sup>3)</sup> 内源性乳酸脱氢酶 (LDH) 会导致背景增高, 因此需要通过脱蛋白处理以去除内源性乳酸脱氢酶 (LDH)。

Q: 配制后的Working Solution稳定性如何, 可以保存多久?

A: Working Solution不稳定, 需要现配现用。光会影响Working Solution的稳定性, 所以配制后请用铝箔纸包裹。配制后的Working Solution在室温避光条件下可以保存4 h。(Working Solution经过光照后, 溶液的颜色会由红色变为橙色, 背景会增高。)

Q：为什么我的样品没有显色？

A：有可能是因为样品的乳酸浓度低于0.02 mmol/l的检测限。如果样品的乳酸浓度低于0.02 mmol/l，将无法用该试剂盒检测，需要采用其它方法，如LC-MS。如果待测样品被稀释，则稀释样品中含有的乳酸浓度可能低于0.02 mmol/l。请调整稀释比例，将检测样品的乳酸浓度调整到最低检测限以上。

Q：是否可以检测含有还原性物质的样品？

A：如果样品中含有还原性物质，也会和WST染料发生显色反应，从而带来误差，不能准确定量乳酸浓度。实验中如遇到以上情况，可以准备药物对照孔（含有药物但不含细胞的培养基+试剂），并用标准品孔和样品孔的吸光度分别减去药物对照孔的吸光度。

Q：该试剂盒可以定量D-乳酸吗？

A：该试剂盒是用于定量L-乳酸，不能定量D-乳酸。

Q：是否可以使用450 nm以外波长的滤光片进行检测？

A：可以使用490 nm的滤光片，但是吸光度会低于在450 nm处的吸光度。

Q：一个试剂盒可以检测多少个样品？

A：在制备标准曲线和样品（n = 3）时，可以检测的样品数量如下表所示：

	50 次	200 次
样品数量 (n=3时)	8个样品 (参照图3排列)	48个样品 (制备2次标准曲线检测时)

制备标准曲线：检测8个浓度梯度的标准品（n=3）（0 mmol/l, 0.0157 mmol/l, 0.0313 mmol/l, 0.0625 mmol/l, 0.125 mmol/l, 0.25 mmol/l, 0.5 mmol/l, 1 mmol/l）

## 参考文献

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](mailto: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12月