



L-Lactate Assay Kit

製品コード: L0507

使用プロトコル

[溶液調製].....	2
[操作方法].....	2

はじめに:L-乳酸測定キットは、細胞培養上清および細胞内における L-乳酸を検出することができます。0.02 mM~1.0 mM の範囲の L-乳酸を検出可能です。検体が標準曲線の測定範囲外にある場合は、緩衝液または超純水で希釈する必要があります。

[溶液調製]

1. Dye Mixture Stock Solution の調製

Lactate Dye Mixture のチューブに超純水を 660 μ L 加えて溶解させます。

※Dye Mixture Stock Solution は 4°C 保管で 6 か月間安定です。

※Dye Mixture Stock Solution は光に敏感なので、遮光保存してください。

2. Working Solution の調製

チューブに以下の溶液を加え、よく混ぜます。

	For 24 wells
Dye Mixture Stock Solution	300 μ L
Lactate Enzyme Mixture	45 μ L
Lactate Cofactor Mixture	195 μ L
Lactate Assay Buffer	2460 μ L

※Working Solution は最長 12 時間保存可能です。

※Working Solution は光に敏感なので、遮光保存してください。

[操作方法]

1. 測定サンプルの準備

< 細胞培養上清中の L-乳酸を測定する場合 >

細胞培養上清の試料を調製します。

※試料は、L-乳酸濃度が 0.02 mM~1.0 mM の範囲になるように調製してください。

※培養液に血清が含まれている場合は、血清を含む培養液の吸光度をバックグラウンドコントロールとして使用してください。その後、各試料の吸光度からこの値を差し引いてください。

※1 回の測定につき、20 μ L の試料を調製してください。.

< 細胞内 L-乳酸を測定する場合 >

対象細胞を以下の手順で処理する:

- 1 $\times$ 10⁵ 個の細胞をマイクロチューブに回収します。
- 300 $\times$ g で 2 分間遠心分離し、上清を除去します。
- 300 μ L の冷 PBS を加え、ピペッティングにより懸濁させ、300 $\times$ g で 2 分間遠心分離し、上清を除去します。

- iv. 300 μL の細胞溶解液 (0.1% Triton™X-100) を加え、1 分間ボルテックスして細胞溶解液を作成します。

※SDS を含む緩衝液の使用は避けてください。細胞溶解液中の SDS は発色を阻害します。

- v. 8,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を回収します。

- vi. 手順 5 の溶液 200 μL を限外ろ過膜フィルター (分子量カットオフ: 10K) に移し、12,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、ろ液を回収して測定サンプルとします。

※内在性乳酸脱水素酵素 (LDH) はバックグラウンド干渉を引き起こすため、タンパク質除去処理により除去してください。

※異なる希釈率の試料を調製し、0.02mM~1.0mM の範囲で適切な希釈率を決定してください。

※1 回の測定につき 20 μL の試料を調製してください。

2. L-乳酸標準液の調製

マイクロチューブに 10 mM Lactate Standard Solution 50 μL と希釈液 450 μL を混合し、1 mM Lactate Standard Solution を調製します。以下の表の手順に従って、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0157、および 0 mM の Lactate Standard Solution を調製します。

#1	1 mM Lactate	Lactate Standard Solution (10 mM): 50 μL 希釈液: 450 μL
#2	0.5 mM Lactate	1 mM Lactate: 250 μL 希釈液: 250 μL
#3	0.25 mM Lactate	0.5 mM Lactate: 250 μL 希釈液: 250 μL
#4	0.125 mM Lactate	0.25 mM Lactate: 250 μL 希釈液: 250 μL
#5	0.0625 mM Lactate	0.125 mM Lactate: 250 μL 希釈液: 250 μL
#6	0.0313 mM Lactate	0.0625 mM Lactate: 250 μL 希釈液: 250 μL
#7	0.0157 mM Lactate	0.0313 mM Lactate: 250 μL 希釈液: 250 μL
#8	0 mM Lactate (Blank)	希釈液: 250 μL

※各標準液は最低 20 μL 必要です。

※細胞培養上清の L-乳酸濃度を測定する場合は、希釈液として超純水で希釈してください。

※細胞内 L-乳酸濃度を測定する場合は、希釈液として 0.1% Triton™-X 溶液を使用してください。

※希釈した Lactate Standard Solution は、12 時間以内に使用してください。

3. 測定

- i. 96 ウェルプレート別のウェルに、Lactate Standard Solution および測定サンプルを各 20 μ L ずつ加えます。

※正確なデータを得るため、検体ごとに 3 回測定することを推奨します。

- ii. 各ウェルに 80 μ L の Working Solution を加えます。

※反応液をウェルに加えるとすぐに酵素反応が始まります。マルチチャンネルピペットを使用してください。

- iii. マイクロプレートを 37°C で 30 分間インキュベートします。

※蒸発を防ぐため、マイクロプレートにカバーを被せてください。

- iv. マイクロプレートリーダーを用いて、450 nm での吸光度を測定します。標準曲線を用いて、サンプル中の L-乳酸濃度を算出します。

※本アッセイのために元のサンプルを希釈している場合は、算出された値に希釈倍率を乗じてください。

4. 試料中の L-乳酸の測定

- i. 各標準液および測定サンプルの平均吸光度 (A_{450nm}) を算出します。

- ii. 各標準液および測定サンプルの吸光度からブランク (標準液 #8) の吸光度を差し引き、ベースライン補正値を求めます。

$$A_{std,corr} = A_{std} - A_{blank}$$

$$A_{sample,corr} = A_{sample} - A_{blank}$$

※ A_{blank} は標準液 #8 の吸光度

- iii. 補正した各標準液の値を濃度に対してプロットし、直線的な標準曲線を作成します。傾き (a) と切片 (b) を求めます。

$$y = ax + b$$

- iv. 各測定サンプルの L-乳酸濃度を算出します。

$$C_{sample} = \frac{A_{sample,corr} - b}{a} \times N$$

* A_{std} は標準液 (#1~7) の平均吸光度 (A_{450nm})

* A_{blank} はブランク標準液 (#8) の平均吸光度 (A_{450nm})

* A_{sample} は測定サンプルの平均吸光度 (A_{450nm})

* a は L-乳酸標準曲線の傾き

* b は y 切片

* N は希釈倍率

* C_{sample} は測定サンプルの L-乳酸濃度 (mM)

5. 計算例

吸光度が $A_{sample} = 0.53$ 、 $A_{blank} = 0.077$ で、希釈倍率が 20 の場合は、以下の通りの計算になります。

$$A_{sample,corr} = 0.53 - 0.077 \\ = 0.453$$

$$C_{sample} = \frac{0.453 - 0.003}{1.503} \times 20 \\ = 5.98 \text{ (mM)}$$

