

EZ- Lactate Assay Kit

Metabolism Assay Kit
(Colorimetric/Fluorometric)

Cat. No. DG-LAC100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Lactate는 산소가 없거나 낮은 상황에서 lactate dehydrogenase에 의해 생성되는 대사물이며, 특정질환시 변동함으로써 대사, 순환의 상태 등을 가리키는 하나의 지표로 생물학적 과정에 있어 중요한 역할을 합니다. Lactate는 L(+)형과 D(-)형의 두 광학이성질체가 존재하지만, 인체에는 L형인 L-Lactate가 생산되어 주로 존재하고 1~5% 정도만이 D형으로 존재합니다.

EZ-Lactate assay kit는 L-Lactate와 특이적으로 반응하는 효소반응을 이용하여 직접적으로 시료 내 L-Lactate의 농도를 검출할 수 있습니다. 사용하는 probe는 흡광(O.D. 570 nm) 및 형광(Ex/Em = 535/590 nm) 방식을 동시에 사용할 수 있어 사용자의 장비 또는 검출 감도에 맞는 방식을 선택할 수 있습니다.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage (reconstituted)
Lactate Assay buffer	25 mL	-	-20 °C, 2개월
Lactate Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20 °C, 2개월
Lactate Probe	200 µL	Yellow	-20 °C, 2개월
L(+)-Lactate Standard (100mM)	100 µL	Green	-20 °C, 2개월

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 100 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 100개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이 중 standard, blank, sample당 duplication 처리 등을 고려하면 실제 테스트 가능한 시료의 숫자는 20~40 samples의 범위에 있습니다. 제품설명서를 자세히 검토하고, 테스트하고자 하는 샘플의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

▪ Sample type

- Serum, Plasma, Blood
- Animal tissue, Cell line

■ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
Lactate Enzyme mix	220 μl Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이 용하여 잘 혼합해 줍 니다.	혼합한 용액은 -20 °C에서 2개월 동안 안정합니다.
Lactate Probe	상온에서 충분히 녹여 서 사용합니다.	사용하고 남은 용액은 -20 °C에 보관할 수 있으나 2개월 이내에 사용하십시오.
L(+)-Lactate Standard	상온에서 충분히 녹여 서 사용합니다.	사용하고 남은 용액은 -20 °C에 보관할 수 있으나 가급 적 2개월 이내에 사용하십시오.

* Assay buffer는 실험 전 상온에서 충분히 warming up 한 후 사용합니다.

차가운 상태의 buffer 사용시 enzyme 활성이 억제되어 결과에 영향을 줄 수 있습니다.

■ General Protocol

1. Standard preparation

1) Colorimetric method

100 mM Lactate standard 10 μl 와 Assay buffer 990 μl 를 섞어 1 mM Lactate standard solution을 준비합니다. 96 well plate에 standard solution을 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 씩 분주하고 Assay buffer로 최종 volume을 50 μl 로 조정하면 각 well에 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/well의 standard가 됩니다.

Standard No.	Volume of 1 mM L(+)-Lactate standard	Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard amount in well (nmol/well)
1	0 μl	50 μl	50 μl	0
2	2 μl	48 μl	50 μl	2
3	4 μl	46 μl	50 μl	4
4	6 μl	44 μl	50 μl	6
5	8 μl	42 μl	50 μl	8
6	10 μl	40 μl	50 μl	10

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것이 좋습니다.

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

2) Fluorometric method

100 mM Lactate standard 10 μl 와 Assay buffer 990 μl 를 섞어 1 mM Lactate standard solution을 준비합니다. 희석된 1 mM Lactate standard 10 μl 와 Assay buffer 990 μl 를 섞어 0.01 mM Lactate standard solution을 준비합니다. 96 well plate에 standard solution을 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 씩 분주하고 Assay buffer로 최종 volume을 50 μl 로 조정하면 각 well에 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 nmol/well의 standard가 됩니다.

Standard No.	Volume of 0.01 mM L(+)-Lactate standard	Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard amount in well (nmol/well)
1	0 μl	50 μl	50 μl	0
2	2 μl	48 μl	50 μl	0.02
3	4 μl	46 μl	50 μl	0.04
4	6 μl	44 μl	50 μl	0.06
5	8 μl	42 μl	50 μl	0.08
6	10 μl	40 μl	50 μl	0.10

- * 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것이 좋습니다.
- * Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

2. Sample preparation

준비된 sample을 96 well plate에 2~50 μl 넣은 후, 최종 volume은 Assay buffer로 50 μl 가 되도록 조정합니다. ($n \geq 2$)

1) Cell or Tissue

- ① 2~20 $\times 10^6$ cells 또는 약 10 mg tissue sample을 준비합니다.
- ② PBS를 이용하여 sample을 washing 해줍니다.
- ③ Sample에 Assay buffer를 넣고 얼음에서 homogenizer나 sonicator를 이용하여 분쇄합니다.
- ④ 분쇄된 sample을 10,000 $\times g$ 로 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액을 사용합니다.

2) Serum, plasma, blood

전처리 없이 Assay buffer를 이용하여 희석하여 사용합니다.

- 3) 처음 측정하는 시료의 경우 측정 값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.

- 4) 시료의 측정 값이 높은 background 값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 시료를 sample background control로 준비합니다.

3. Reaction mixture preparation

* Colorimetric method / Fluorometric method 모두 동일하게 진행합니다.

1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay양을 계산하여 여유 있게 reaction mix를 준비합니다.

Components	Reaction mixture	Background Reaction mixture
Lactate Assay buffer	46 $\mu\ell$	48 $\mu\ell$
Lactate Enzyme mix	2 $\mu\ell$	-
Lactate Probe	2 $\mu\ell$	2 $\mu\ell$
Total	50 $\mu\ell$	50 $\mu\ell$

4. Reaction mixture를 L-Lactate standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50 $\mu\ell$ 씩 넣어준 후 잘 섞어줍니다.

* Colorimetric method / Fluorometric method 모두 동일하게 진행합니다.

* background control을 준비한 경우에는 background control well에 background mixture를 넣어줍니다.

5. Plate를 빛이 차단된 실온에서 30분간 반응시킨 후, 부드럽게 shaking 하여 micro plate reader로 측정합니다.

1) Colorimetric : 570 nm

2) Fluorometric : (Excitation/Emission): 535 nm / 595 nm

▪ Calculation

1. 모든 측정값에서 blank의 O.D. 값을 빼줍니다.

* Blank = OD_{570nm} from Lactate standard #1 (0 nmol Lactate)

2. Lactate standard 의 농도(X 축)에 대한 O.D. 값(Y축)을 이용하여 표준곡선을 그려 선형 방정식을 구합니다.

3. 표준곡선에 의해 나타낸 선형 방정식을 이용하여 각 시료에 대한 농도를 계산합니다.

4. Standard curve에 sample 측정값 수치를 대입하여 Lactate 양을 계산하여 줍니다.

* Background control을 설정한 경우 sample 측정값에서 background control 측정값을 뺀 수치를 대입하여 Lactate 양을 계산하여 줍니다.

5. 4에서 계산된 Lactate 양을 바탕으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Lactate의 농도를 계산합니다.

$$\text{Sample 내 Lactate 농도 (C)} = B/V \times D \text{ (nmol/}\mu\ell \text{ or mM)}$$

B : Standard curve로부터 구한 측정 well의 Lactate의 양 (nmol)

V : well에 분주한 시료의 양 ($\mu\ell$)

D : 샘플 희석배율 (ex. 2배 희석한 경우 x1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)

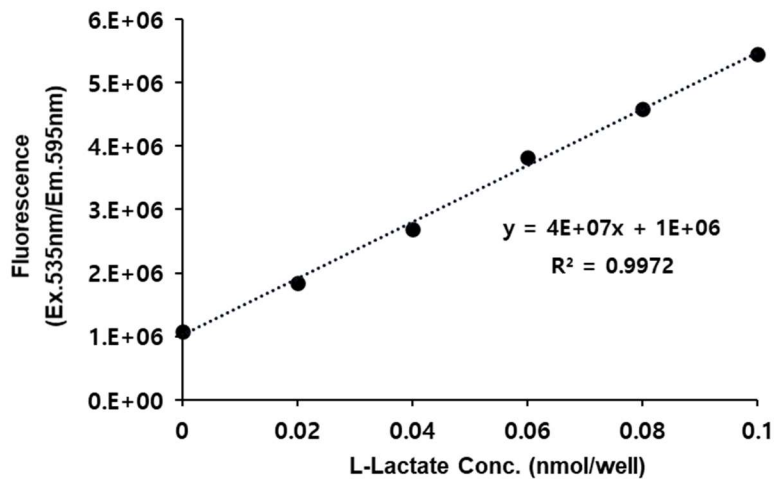
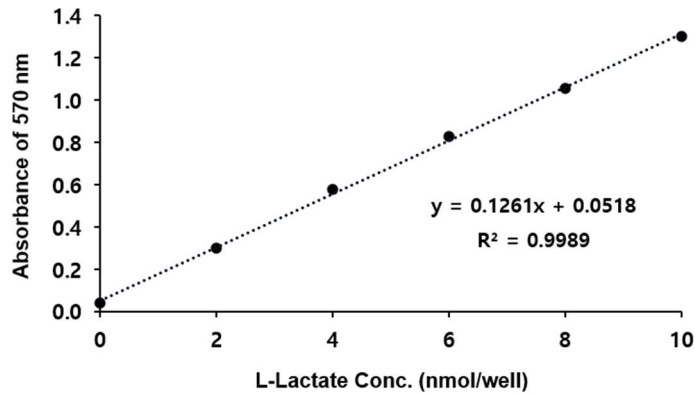


Fig. Lactate standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Cell Proliferation / Cytotoxicity	EZ-Cytox	EZ-500	500 Assay
		EZ-1000	1000 Assay
		EZ-3000	3000 Assay
		EZ-5000	5000 Assay
		EZ-BULK150	10000 Assay
	EZ-Cytox ^{PLUS}	EZ-3000P	3000 Assay
Cell Cytotoxicity	EZ-LDH	DG-LDH500	500 Assay
		DG-LDH1000	1000 Assay