

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ046

产品规格：48T/96T

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 490 nm，发射波长 535 nm)

Elabscience®细胞外酸化率(ECAR)荧光法测试盒

Extracellular Acidification Rate (ECAR)

Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本的细胞外酸化率(ECAR)，分析糖酵解的程度。

检测原理

细胞代谢过程中，主要由有氧呼吸或无氧呼吸提供能量。在细胞进行无氧呼吸时，会产生大量的酸性物质，这些物质被细胞膜泵排到细胞外环境中，导致细胞外环境的酸化，因此，细胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR)是一个评估细胞代谢过程中无氧呼吸产生的酸性物质的重要指标，它的变化能反映细胞代谢状态的改变。

本测试盒使用特异性的探针（Ex/Em：490 nm/535 nm），当细胞外环境的pH 发生变化时，探针的荧光值也会相应发生变化。发生酸化的细胞外环境会使探针的荧光值降低，以此来检测细胞外的酸化率。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	盐溶液 (Saline Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	探针 (Probe)	液体×1 支	液体×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	黑色透底培养板	96 孔×2 板		无要求
	样本位置标记表	2 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪（激发波长 490 nm，发射波长 535 nm）、37℃ 恒温箱

试剂：DMSO（二甲基亚砷）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 高浓度探针储备液的配制：

取一支试剂二，加入270 μL DMSO（二甲基亚砷），混匀稀释，得到高浓度探针储备液，未用完的溶液，分装后-20℃可保存两周。

③ 探针工作液的配制：

根据实验实际需求量，按照试剂一：高浓度探针储备液= 195: 5的体积比配制，充分混匀，现配现用，按需配制，探针工作液中的探针浓度可根据实验结果适当调整（探针工作液需求量可参考下表）。

	1 个孔	10 个孔	50 个孔	100 个孔
试剂一(μL)	195	1950	9750	19500
高浓度探针储备液(μL)	5	50	250	500
探针工作液体积 (μL)	200	2000	10000	20000

实验关键点

- ① 试剂一与探针工作液提前预热至37°C，检测仪器需提前设置为37°C，建议提前1 h进行预热。
- ② ECAR检测值与细胞种类与数量相关，预实验检测时建议高细胞量接种，单位时间荧光值变化不明显时，可尝试调整细胞量。
- ③ 细胞样本加入探针工作液后，应避免使用5%二氧化碳细胞培养箱37°C孵育，防止高浓度二氧化碳进入检测体系影响检测结果。
- ④ 如需要对细胞样本进行药物处理，且药物作用时间较长超过1 h，建议在接种前进行药物处理。
- ⑤ 试剂一中含有葡萄糖可满足细胞短期代谢活动需求。

操作步骤

悬浮细胞实验步骤

1. 根据实验需要对细胞培养与处理。
2. 检测前提前将荧光酶标仪升温为 37°C。
3. 收集细胞并进行细胞计数，取约 2.5×10^5 个细胞， $500 \times g$ 离心 5 min，弃去上清液。
4. 用 200 μL 探针工作液重悬步骤 2 中的细胞。
5. 轻微吸打，混匀细胞，取 150 μL 上述步骤 4 重悬细胞后的探针工作液加入 96 孔黑色透底酶标对应的实验孔中。
6. 向空白孔加入 150 μL 探针工作液（空白孔无细胞，用于测定探针本身荧光值变化）。
7. 荧光酶标仪于激发波长 490 nm，发射波长 535 nm 处检测各孔荧光值，每隔 2-3 min 检测一次，总时间约 100-120 min，绘制荧光值随时间变化的曲线图，选择线性段计算细胞外酸化率(ECAR)。

贴壁细胞实验步骤

1. 根据实验需要设置实验孔与空白孔（实验孔为根据实验需要对细胞样本进行不同处理的板孔；空白孔不接种细胞，只加入探针工作液，用于测定探针本身荧光值变化）。
2. 接种 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个细胞至 96 孔黑色透底酶标板孔中，在 37°C 、5% CO_2 培养箱中过夜培养贴壁。
3. 检测前提前将荧光酶标仪升温为 37°C 。
4. 按实验需要对细胞样本进行药物处理,各实验孔加入 10 μL 药物处理（如药物作用时间较长超过 1 h，建议在接种前进行药物处理）。
5. 小心弃去培养上清，依次向空白孔和实验孔中加入 200 μL 探针工作液。
6. 荧光酶标仪于激发波长 490 nm，发射波长 535 nm 处检测各孔荧光值，每隔 2-3 min 检测一次，总时间约 100-120 min，绘制荧光值随时间变化的曲线图，选择线性段计算细胞外酸化率(ECAR)。

结果计算

细胞样本外环境酸化率（ECAR）计算公式：

$$\text{ECAR} = \frac{\Delta F_{\text{测定}} - \Delta F_{\text{空白}}}{\Delta T}$$

注解：

选择荧光值随时间呈线性的时间段 $T_1 \sim T_2$ 计算 ECAR。 T_1 时检测各孔的荧光值为 F_1 ， T_2 时检测各孔的荧光值为 F_2 。

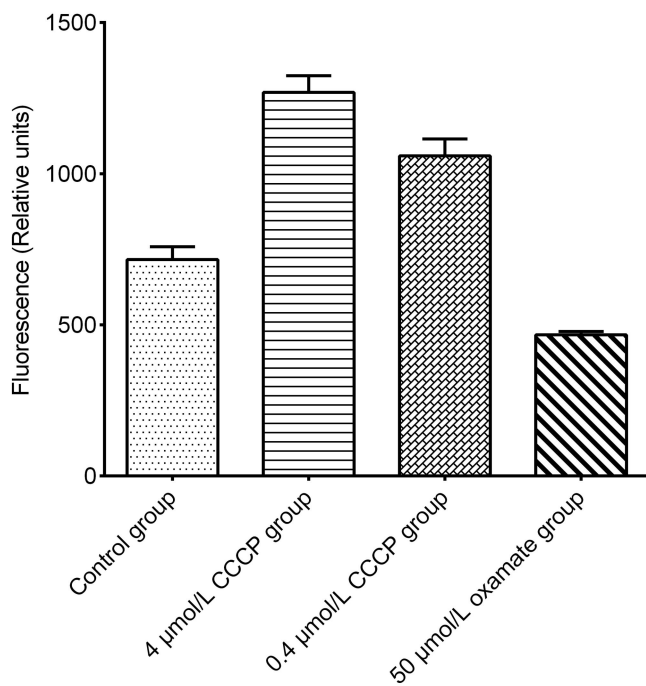
$\Delta F_{\text{测定}}$ ：测定孔变化荧光值， $F_1 - F_2$

$\Delta F_{\text{空白}}$ ：空白孔变化荧光值， $F_1 - F_2$

ΔT ：荧光值变化时间 $T_2 - T_1$ ，min

附录1 关键数据

1. 药物处理组（CCCP为解偶联药物，oxamate为糖酵解抑制药物）与测定组 ΔF 对比



附录2 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
没有检测到荧光值 或荧光值低	细胞密度不够	增加细胞密度
	探针浓度不够	增加探针浓度
	孵育时间不够	适当增加孵育时间

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

