

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F084

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®糖酵解压力荧光法试剂盒

Glycolysis Stress 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

本试剂盒适用于评价细胞样本在不同条件下糖酵解的能力。

检测原理

糖酵解是真核细胞中重要的 ATP 生成途径。糖酵解压力测试可以直接测量细胞外酸化速率 (ECAR) 来评估活细胞糖酵解过程变化, 可以获得全面评估糖酵解通路的关键参数, 包括: 糖酵解、糖酵解能力、糖酵解储备和非糖酵解的酸化。

本测试盒使用 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG) 和寡霉素来促进对细胞糖酵解通量的深入分析: 2-DG 通过竞争性己糖激酶抑制来阻断糖酵解, 从而量化非糖酵解细胞外酸化 (ECA); 寡霉素抑制 ATP 合成酶, 因此阻止有氧 ATP 的生成, 迫使细胞增加糖酵解通量以满足 ATP 的需求。在测试条件下可达到的这种代偿性糖酵解水平可以揭示基础条件下不明显的糖酵解扰动, 并有助于评估 ATP 需求有限的糖酵解能力。

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°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	探针 (Probe)	0.03 mL×1 支	0.03 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	葡萄糖 (Glucose)	0.09 g×1 支	0.09 g×2 支	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	寡霉素 (Oligomycin)	0.06 mL×1 支	0.06 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	2-DG (2-Deoxy Glucose)	0.3 mL×1 支	0.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色透底酶标板	2 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同试剂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）、恒温培养箱

试剂：DMSO（二甲基亚砜）

耗材：0.22 μm 滤膜、注射器

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 葡萄糖储备液的配制：

取一支试剂三，加入0.5 mL双蒸水，混匀稀释，得到葡萄糖储备液，未使用完的溶液，分装后2-8℃可保存一个月。

③ 寡霉素储备液的配制：

取一支试剂四，加入2.94 mL试剂一，混匀稀释，得到寡霉素储备液，未使用完的溶液，分装后-20℃可保存两周。

④ 呼吸缓冲液的配制：

按葡萄糖储备液：试剂一 = 1 : 50的体积比配制呼吸缓冲液，配制好的溶液用0.22 μm 滤膜过滤，分装后4℃可保存三周。

⑤ 探针储备液的配制：

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

⑥ 测定工作液的配制：

根据实验实际需求量，按照呼吸缓冲液：探针储备液=95:5的体积比配制，充分混匀，现配现用，当天使用有效，按需配制，工作液中的探针浓度可根据实验结果适当调整（工作液需求量可参考下表）：

	1个孔	10个孔	50个孔	100个孔
呼吸缓冲液(μL)	95	950	4750	9500
探针储备液(μL)	5	50	250	500
测定工作液体积 (μL)	100	1000	5000	10000

⑦ 无葡萄糖工作液的配制：

根据实验实际需求量，按照试剂一：探针储备液=95:5的体积比配制，充分混匀，现配现用，当天使用有效。

实验关键点

- ① 建议使用处于对数生长期的细胞。
- ② 所用酶标仪与加入体系的试剂需要提前孵育至37℃。

操作步骤

悬浮细胞：根据实验设计进行细胞培养，确保细胞健康且不会过度生长。收集细胞，4℃，500 ×g 离心 5 min，弃去上清液，用试剂一重悬细胞，建议细胞密度为 2×10^5 个/mL，如 2×10^5 个细胞，用 1 mL 试剂一重悬。设计测定孔、寡霉素对照孔、2-DG 对照孔和空白孔。将细胞悬液加入到相应的 96 孔黑色透底酶标板孔中，每孔加入 100 μL 细胞悬液(空白孔用相同体积试剂一代替细胞悬液)。

贴壁细胞：根据实验设计进行细胞培养，确保细胞健康且不会过度生长。设计测定孔、寡霉素对照孔、2-DG 对照孔和空白孔。将细胞接种至 96 孔黑色透底酶标板孔中，推荐接种细胞密度为 2×10^5 /mL，每孔 100 μL 细胞悬液。细胞接种完毕放入 37℃ 二氧化碳培养箱，静置培养过夜后，去除细胞培养液，每孔加入 100 μL 试剂一(空白孔为不接种细胞的孔)。

- ① 将酶标板置于无 CO₂ 的培养环境中，37℃ 避光孵育 30 min。
- ② 将荧光酶标仪温度设置为 37℃。
- ③ 寡霉素对照孔：向步骤①中寡霉素对照孔加入 10 μL 寡霉素储备液。
2-DG 对照孔：向步骤①中 2-DG 对照孔加入 10 μL 试剂五 (2-DG)。
- ④ 测定孔和空白孔：向步骤③中测定孔和空白孔加入 100 μL 测定工作液。
寡霉素对照孔：向步骤③中寡霉素对照孔加入 90 μL 测定工作液。
2-DG 对照孔：向步骤③中 2-DG 对照孔加入 90 μL 无葡萄糖工作液。
- ⑤ 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 2-5 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:

$$\text{ECAR (Flourescence units/min)} = \frac{\Delta F_{\text{测定}} - \Delta F_{\text{空白}}}{\Delta T}$$

注解:

选择荧光值随时间呈线性的时间段 T_1 - 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 。

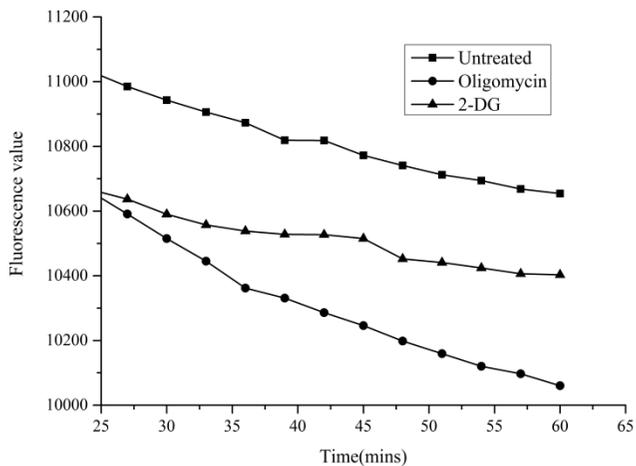
$\Delta F_{\text{测定}}$: 各组别实验孔变化荧光值, F_1 - F_2

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

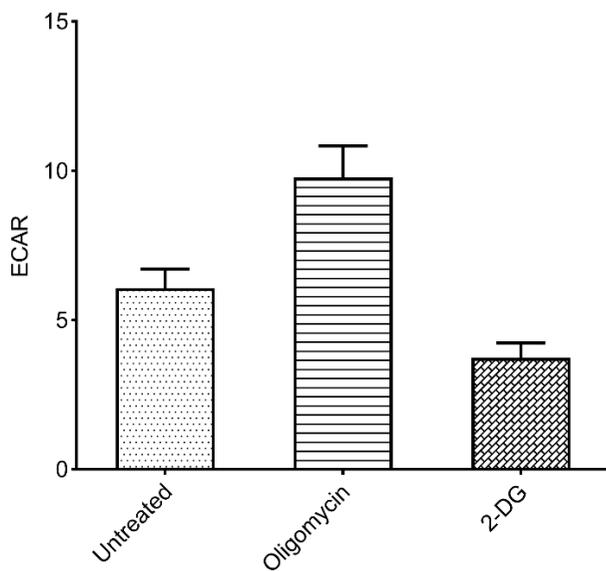
ΔT : 荧光值变化时间 T_2 - T_1 , min

附录1 关键数据

1. 未处理组、寡霉素处理组、2-DG处理组荧光值随时间变化趋势图



2. 未处理组、寡霉素处理组、2-DG处理组的酸化率



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同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。

