

(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-F069

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, 能量的产生需要进行有氧呼吸或无氧呼吸。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°C 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 探针 (Probe) | 液体×1 支 | 液体×2 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| | 黑色透底培养板 | 2 板 | | |
| | 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 °C 恒温培养箱

试剂：DMSO（二甲基亚砜）

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（二甲基亚砜），混匀稀释，得到高浓度探针储备液，未用完的溶液，分装后-20 °C可保存两周。

③ 工作液的配制：

根据实验实际需求，按照试剂一：高浓度探针储备液= 95: 5的体积比配制，充分混匀，现配现用，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 |
|---------------------------|------|-------|-------|--------|
| 试剂一(μL) | 95 | 950 | 4750 | 9500 |
| 高浓度探针储备液(μL) | 5 | 50 | 250 | 500 |
| 工作液体积 (μL) | 100 | 1000 | 5000 | 10000 |

实验关键点

- ① 试剂一与工作液提前预热至37°C，检测仪器需提前设置为37°C。
- ② ECAR检测值与每孔细胞数量有关，单位时间荧光值变化不明显时，可尝试调整细胞量。
- ③ 试剂一内含20 mM葡萄糖，如对实验设置有影响建议使用HBSS缓冲液或无血清培养基替换试剂一。

操作步骤

悬浮细胞：根据实验设计进行细胞培养，确保细胞状态良好。收集细胞，4°C，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 μ L 细胞悬液(空白孔用相同体积试剂一代替细胞悬液)。根据实验设计加入相应药物刺激细胞。

贴壁细胞：根据实验设计进行细胞培养，确保细胞状态良好。设计测定孔和空白孔。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 μ L 细胞悬液。细胞接种完毕放入 37 °C 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 μ L 试剂一(空白孔为不接种细胞的孔)。根据实验设计加入相应药物刺激细胞。

- ① 接种后细胞，37 °C 避光孵育 30 min，同时将荧光酶标仪温度设置为 37 °C。
- ② 向各孔中加入 100 μ L 工作液，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 。

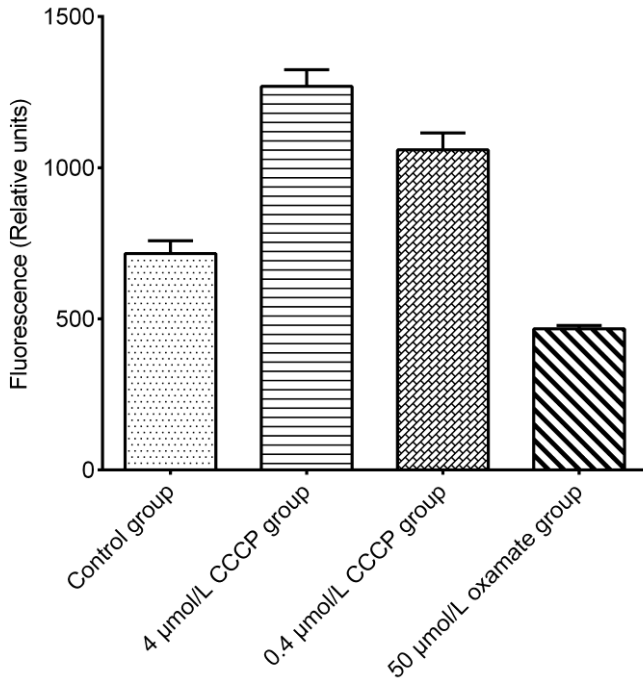
$\Delta F_{\text{测定}}$: 测定孔变化荧光值, $F_1 - F_2$

$\Delta F_{\text{空白}}$: 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。

