

(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-F070

产品规格: 48T/96T

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 405 nm、发射波长 650 nm)

Elabscience®氧消耗率 (OCR) 荧光法 测试盒 (增强型)

Enhanced Oxygen Consumption Rate (OCR) 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的氧消耗率(OCR)。

检测原理

细胞的线粒体氧化磷酸化过程消耗氧气产生 ATP, 为细胞生长提供能量, 因此检测细胞的氧消耗率是研究线粒体功能的关键指标。本试剂盒提供一种荧光探针, 对氧气敏感, 在封闭环境中细胞消耗氧气, 探针荧光随氧气量减少而增加, 通过检测荧光值变化判断细胞的氧消耗率。

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)	探针 (Probe)	0.55 mL×1 支	1.1 mL×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	密封液 (Sealing Solution)	8 mL×1 瓶	8 mL×2 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
	黑色透底培养板	96 孔×2 块		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(具备动力学检测与温控功能; 激发波长 405 nm、发射波长 650 nm)

试剂: 完全培养基, PBS(0.01 M, pH 7.4)

试剂准备

① 各试剂平衡至25℃，试剂一为混悬液，可摇匀后分装，2-8℃避光保存。

② 工作液的配制：

试剂一使用前须混匀，使用细胞相应的完全培养基将试剂一稀释10倍，配成工作液，配好的工作液8 h内使用有效。

实验关键点

① 加入板孔前的所有试剂须 37℃ 预热，检测仪器提前预热至 37℃。

② 按照操作步骤及时检测，避免错过最佳检测时间。

③ 检测过程建议维持检测环境稳定，避免晃动培养板。

④ 药物可使用完全培养基或 PBS(0.01 M, pH 7.4)稀释后使用。

⑤ 试剂一和工作液容易沉降，使用前须混匀。

操作步骤:

荧光酶标仪需要提前将温度预热至 37°C，加入板孔的所有试剂须提前预热至 37°C 待用。

贴壁细胞:

	空白孔	对照孔	样本孔
细胞	--	√	√
工作液(μL)(混匀)	100	100	100
药物(μL)	--	--	10
药物溶剂(μL)	10	10	--
试剂二	2 滴	2 滴	2 滴
使用酶标仪的动力学模式，底部读数，37°C，设置激发波长 405 nm，发射波长 650 nm。每隔 2 min 检测一次，持续检测 90 min 以上。			

- ① 黑色透底细胞培养板设置空白孔、对照孔和样本孔，细胞浓度约 5×10^5 个/mL（实验所需最佳细胞密度需要预实验摸索确定），取 100 μL 细胞悬液接种在对照孔和样本孔中（约 5×10^4 个/孔）；
- ② 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养；
- ③ 培养完后，小心吸出培养基，避免细胞脱落；
- ④ 各孔加入 100 μL 工作液（使用前混匀）；
- ⑤ 将培养板置于酶标仪（37°C）或恒温箱（37°C）孵育 30 min；
- ⑥ 样本孔中加入 10 μL 药物，空白孔和对照孔中加入 10 μL 药物溶剂，立即向每孔加入 2 滴（约 80 μL）试剂二（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）；
- ⑦ 使用酶标仪的动力学模式，底部读数，37°C，设置激发波长 405 nm，发射波长 650 nm，每隔 2 min 检测一次，持续检测 90 min 以上。

悬浮细胞：

	空白孔	对照孔	样本孔
工作液(μL)	100	--	--
细胞工作液悬液(μL)	--	100	100
药物(μL)	--	--	10
药物溶剂(μL)	10	10	--
试剂二	2 滴	2 滴	2 滴
使用酶标仪的动力学模式，底部读数，37℃，设置激发波长 405 nm，发射波长 650 nm。每隔 2 min 检测一次，持续检测 90 min 以上。			

- ① 使用工作液(使用前混匀)重悬细胞，细胞浓度约 5×10^5 个/mL (实验所需最佳细胞密度需要预实验摸索确定)，黑色透底细胞培养板设置空白孔，对照孔和样本孔。空白孔加入 100 μL 工作液（不含细胞），对照孔和样本孔加入 100 μL 细胞工作液悬液（约 5×10^4 个/孔）；
- ② 将培养板置于酶标仪（37℃）或恒温箱（37℃）孵育 30 min；
- ③ 样本孔中加入 10 μL 药物，对照孔和空白孔中加入 10 μL 药物溶剂，立即向每孔加入 2 滴（约 80 μL ）试剂二（如药物作用时间较长超过 1 h，建议在重悬细胞前进行药物处理）；
- ④ 使用酶标仪的动力学模式，底部读数，37℃，设置激发波长 405 nm，发射波长 650 nm，每隔 2 min 检测一次，持续检测 90 min 以上。

结果计算

细胞氧消耗率 (OCR) 计算公式:

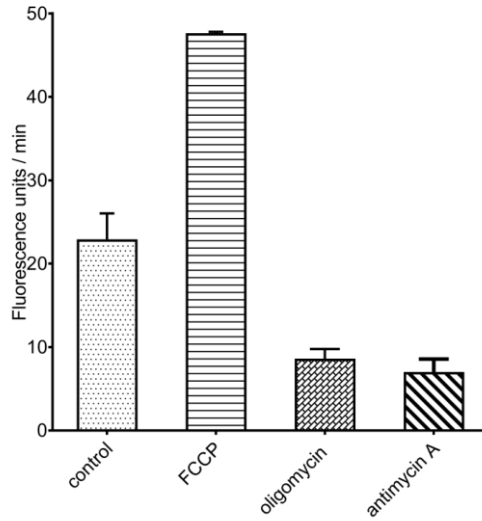
$$\text{OCR (Fluorescence units/min)} = \frac{F_2 - F_1}{\Delta T}$$

注解:

按照荧光值(F)与时间(min)绘制曲线，选择荧光值随时间呈线性的时间段 $T_1 \sim T_2$ 计算 OCR。 T_1 时检测荧光值为 F_1 ， T_2 时检测荧光值为 F_2 ， ΔT 为荧光值变化时间 $T_2 - T_1$ ，min。

附录1 关键数据

A549细胞在添加FCCP，寡霉素和抗霉素A时的耗氧率数据



A549 细胞接种密度为 3×10^5 个/mL, 过夜培养, FCCP 浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$, 寡霉素浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$, 抗霉素 A 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 。

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。