（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-F078

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 675 nm)

Elabscience®线粒体压力荧光法测试盒

Mitochondrial 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

本试剂盒通过检测活细胞的耗氧率（OCR）来呈现细胞线粒体压力。

检测原理

线粒体压力是指线粒体在外界或内在因素(如氧化应激、营养不足、毒素等)影响下，功能受损或超负荷运作时产生的压力状态。这种压力会影响线粒体的能量生产，导致细胞能量不足，并可能引发细胞损伤、炎症反应或促使细胞凋亡。长期的线粒体压力与多种疾病(如神经退行性疾病、心血管疾病、代谢疾病等)以及衰老过程密切相关。

本试剂盒提供一种对氧气敏感的荧光探针，通过细胞消耗氧气引起探针荧光增加。加入调节剂寡霉素、碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腙 FCCP 和抗霉素 A 后，可直观呈现代谢过程对最大呼吸的影响。

寡霉素的加入阻断了 ATP 合成，电子传递速度减慢，呼吸速率降低，耗氧量减少。FCCP 用于研究解偶联状态下线粒体的呼吸活性，FCCP 解偶联氧化磷酸化后，电子传递链(ETC)的质子泵不再受 ATP 合成的限制，电子传递速度加快，耗氧量显著增加，用于测定最大呼吸能力。抗霉素 A 抑制住主呼吸链，依赖复合物 III 的电子传递停止，基础耗氧量显著下降，用于测定备用呼吸速率。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size1)(48 T)	规格 (Size2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	探针 (Probe)	1.5 mL × 1 支	1.5 mL × 2 支	-20ºC 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	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	300 μmol/L 寡霉素 (300 μmol/L Oligomycin)	0.1 mL × 1 支	0.2 mL × 1 支	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	500 μmol/L 碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腙 (500 μmol/L FCCP)	0.1 mL × 1 支	0.2 mL × 1 支	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	200 μmol/L 抗霉素 A (200 μmol/L Antimycin A)	0.1 mL × 1 支	0.2 mL × 1 支	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	100U/mL 葡萄糖氧化酶 (100U/mL GOD)	0.1 mL × 1 支	0.2 mL × 1 支	-20ºC 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(带温控功能；激发波长 405 nm、发射波长 675 nm)

试剂：完全培养基

试剂准备

① 各试剂平衡至室温(25°C),试剂一可分装后-20°C避光保存,避免反复冻融。

② 探针工作液的配制：

使用相应的细胞完全培养基将试剂一稀释5-15倍，配成探针工作液，配制好的探针工作液8 h内使用有效。

③ 寡霉素工作液的配制：

使用相应的细胞完全培养基将试剂三寡霉素浓度稀释至20-60 μmol/L，稀释后的寡霉素工作液8 h内使用有效。

④ FCCP工作液的配制：

使用相应的细胞完全培养基将试剂四 FCCP浓度稀释至20-40 μmol/L，稀释后的FCCP工作液8 h内使用有效。

⑤ 抗霉素A工作液的配制：

使用相应的细胞完全培养基将试剂五抗霉素A浓度稀释至10-20 μmol/L，稀释后的抗霉素A工作液8 h内使用有效。

⑥ GOD工作液的配制：

使用双蒸水将试剂六GOD稀释至5 U/mL，稀释后的GOD工作液8 h内使用有效。GOD工作液作为阳性对照使用，在转化葡萄糖的过程消耗氧气，使用时需要根据培养基的组分判断是否需要外加葡萄糖。

实验关键点

① 加入板孔前的所有试剂须 37°C 预热，检测仪器提前预热至 37°C。

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 单位时间荧光值变化不明显时，可尝试调整细胞量或增加探针工作液加入体积(不超过 200 μL)。

操作步骤：

荧光酶标仪需要提前将温度设置在 37°C，检测过程避免混匀。

贴壁细胞：

	空白孔	对照孔	寡霉素孔	FCCP 孔	抗霉素 A 孔	GOD 孔
接种细胞	√	√	√	√	√	--
探针工作液(μL)	--	100	100	100	100	100
完全培养基(μL)	100	--	--	--	--	--
将培养板置于酶标仪(37°C)孵育 30 min						
寡霉素工作液(μL)	--	--	10	--	--	--
FCCP 工作液(μL)	--	--	--	10	--	--
抗霉素 A 工作液(μL)	--	--	--	--	10	--
GOD 工作液(μL)	--	--	--	--	--	10
完全培养基(μL)	10	10	--	--	--	--
试剂二	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴
使用酶标仪的动力学模式，底部读数，检测激发波长 405 nm，发射波长 675 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、寡霉素孔、FCCP 孔、抗霉素 A 孔、GOD 孔，每孔建议做三个复孔，除 GOD 孔外其余各孔加 100 μL 细胞悬液接种(细胞浓度约 5×10^5 个/mL，即约 5 × 10^4 个/孔)；

② 37°C、5% CO_2 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 空白孔加入 100 μL 培养基，其余各孔加入 100 μL 探针工作液；

⑤ 将培养板置于酶标仪(37°C)孵育 30 min；

⑥ 对照孔和空白孔：加入 10 μL 完全培养基；

寡霉素孔：加入 10 μL 寡霉素工作液；

FCCP 孔：加入 10 μL FCCP 工作液；

抗霉素 A 孔：加入 10 μL 抗霉素 A 工作液；

GOD 孔：加入 10 μL GOD 工作液；

⑦ 立即向每孔加入 2 滴(约 80 μL)试剂二；

⑧ 使用酶标仪的动力学模式，底部读数，37°C，检测激发波长 405 nm，发射波长 675 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**	**寡霉素孔**	**FCCP 孔**	**抗霉素 A 孔**	**GOD 孔**
细胞培养基悬液(μL)	100	--	--	--	--	--
细胞工作液悬液(μL)	--	100	100	100	100	--
探针工作液(μL)	--	--	--	--	--	100
将培养板置于酶标仪(37°C)孵育 30 min						
寡霉素工作液(μL)	--	--	10	--	--	--
FCCP 工作液(μL)	--	--	--	10	--	--
抗霉素 A 工作液(μL)	--	--	--	--	10	--
GOD 工作液(μL)	--	--	--	--	--	10
完全培养基(μL)	10	10	--	--	--	--
试剂二	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴
使用酶标仪的动力学模式，底部读数，检测激发波长 405 nm，发射波长 675 nm。每隔 2 min 检测一次，持续检测 90 min 以上。						

① 分别使用培养基和探针工作液重悬细胞，细胞浓度约 5×10^6 个/mL，黑色透底细胞培养板设置空白孔、对照孔、寡霉素孔、FCCP 孔、抗霉素 A 孔、GOD 孔，每孔建议做三个复孔。

② 空白孔：加入 100 μL 细胞培养基悬液(约 5 × 10^5 个/孔)，

对照孔、寡霉素孔、FCCP 孔、抗霉素 A 孔：加入 100 μL 细胞工作液悬液(约 5 × 10^5 个/孔)；

GOD 孔：加入 100 μL 探针工作液；

③ 将培养板置于酶标仪(37°C)孵育 30 min；

④ 对照孔和空白孔：加入 10 μL 完全培养基；

寡霉素孔：加入 10 μL 寡霉素工作液；

FCCP 孔：加入 10 μL FCCP 工作液；

抗霉素 A 孔：加入 10 μL 抗霉素 A 工作液；

GOD 孔：加入 10 μL GOD 工作液；

⑤ 立即向每孔加入 2 滴(约 80 μL)试剂二；

⑥ 使用酶标仪的动力学模式，底部读数，37°C，检测激发波长 405 nm，发射波长 675 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：

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

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-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。

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。