

氧消耗率荧光法检测试剂盒说明书

规格：荧光法 48样

检测波长：激发波长405nm

编号：JLC_K14816

发射波长650nm

检测原理：化学荧光法

注意

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样品做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；。

测定意义

细胞的氧气主要在线粒体氧化磷酸化过程中被消耗，产生三磷酸腺苷(ATP)，因此耗氧率(OCR: Oxygen Consumption Rate)是分析线粒体功能的一个重要指标。

测定原理

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。

需自备的仪器和用品

荧光酶标仪、黑色96孔板（透明底）、可调式移液器、完全培养基、PBS(0.01M, pH7.4)

。

试剂清单

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
试剂一	探针0.55 mL	×1	4°C, 避光	试剂一为混悬液，可摇匀后分装；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8h内使用有效。
试剂二	密封液8 mL	×1	4°C	

样品处理与测定（按照步骤依次操作）

一. 贴壁细胞

- (1) 黑色透底细胞培养板设置空白孔，对照孔和样品孔，细胞浓度约 5×10^5 个/mL(实验所需最佳细胞浓度需要预实验摸索确定)，取100 μ L细胞悬液接种在对照孔和样品孔中(约 5×10^4 /孔)；
- (2) 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中过夜培养；
- (3) 吸去培养基(注意尽量不要剥落细胞)；
- (4) 各孔加入100 μ L工作液(使用前混匀)；
- (5) 将培养板置于酶标仪(37 $^{\circ}$ C)或恒温箱(37 $^{\circ}$ C)孵育30min；
- (6) 样品孔中加入10 μ L药物，空白孔和对照孔中加入10 μ L药物溶剂，立即向每孔加入2滴(约80 μ L)试剂二(如药物作用时间较长超过1h，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 $^{\circ}$ C，设置激发波长405nm，发射波长650nm，每隔2min检测一次，持续检测90min以上。

试剂名称	空白孔	对照孔	样品孔
细胞	-	√	√
工作液(μ L)	100	100	100
将培养板置于酶标仪(37 $^{\circ}$ C)或恒温箱(37 $^{\circ}$ C)孵育30min			
药物	-	-	10
药物溶剂	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 $^{\circ}$ C，设置激发波长405nm，发射波长650nm。 每隔2min检测一次，持续检测90min以上。			

二. 悬浮细胞

- (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，对照孔和样品孔。空白孔加入100 μ L工作液(不含细胞)，对照孔和样品孔加入100 μ L细胞工作液悬液(约 5×10^4 个/孔)；
- (2) 将培养板置于酶标仪(37 $^{\circ}$ C)或恒温箱(37 $^{\circ}$ C)孵育30min；
- (3) 样品孔中加入10 μ L药物，对照孔和空白孔中加入10 μ L药物溶剂，立即向每孔加入2滴(约80 μ L)试剂二(如药物作用时间较长超过1h，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 $^{\circ}$ C，设置激发波长405nm，发射波长650nm，每隔2min检测一次，持续检测90min以上。

试剂名称(μ L)	空白孔	对照孔	样品孔
工作液	100	-	-
细胞工作液悬液	-	100	100
将培养板置于酶标仪(37 $^{\circ}$ C)或恒温箱(37 $^{\circ}$ C)孵育30min60			
药物	-	-	10
药物溶剂	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 $^{\circ}$ C，设置激发波长405nm，发射波长650nm， 每隔2min检测一次，持续检测90min以上。			

结果计算

细胞氧消耗率 (OCR) 计算公式:

$$\text{OCR(Fluorescence units/min)} = (F2 - F1) \div \Delta T$$

注: 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T1~T2计算OCR。 T1时检测荧光值为F1, T2时检测荧光值为F2, ΔT 为荧光值变化时间T2-T1, min。

注意事项

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. 药物可使用完全培养基或PBS(0.01M, pH7.4)稀释后使用。
5. 试剂一和工作液容易沉降, 使用前须混匀。
6. 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。
7. 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。