

氧消耗率(OCR)荧光法

规格： 荧光法 48 样

检测波长： 激发波长 405nm

检测原理： 化学荧光法

发射波长 650nm

编号： ml300804

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。

自备仪器和用品：

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 2 min 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 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。			

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。