# 氧消耗率(OCR)检测试剂盒

货号: KTA9010　　规格：48 T/96 T　　批号：见产品标签

| | |
|---|---|
| | **应用实验：**荧光酶标仪 |
| | **荧光激发/发射：**Ex/Em=405/650 nm |
| | **保质期：**4℃，避光保存 6 个月 |

## 01 背景与原理

细胞耗氧主要来源于线粒体氧化磷酸化，该过程驱动 ATP 生成，细胞的氧消耗速率（Oxygen Consumption Rate, OCR）是评价线粒体功能的重要指标。研究发现，肿瘤细胞偏好利用产能效率更低的糖酵解合成 ATP；免疫细胞以氧化磷酸化代谢为主时抗肿瘤能力受到抑制，糖酵解占优则抗肿瘤效应增强，因此 OCR 常用于表征细胞能量代谢表型。

本试剂盒所用探针可与氧气结合引发磷光淬灭，信号强度与培养基溶解氧浓度呈负相关。线粒体呼吸持续耗氧导致胞外溶解氧降低，探针淬灭程度减弱，最终探针检测信号随氧气消耗逐渐升高。

## 02 包装清单

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存要求 |
|---|---|---|---|
| | 48 T | 96 T | |
| **OCR-Probe** | 0.5 mL | 1 mL | 4℃，避光保存 |
| **Mineral Oil** | 10 mL | 10 mL×2 | 4℃ |
| **10 mM CCCP** | 0.25 mL | 0.5 mL | 4℃，避光保存 |
| **100 U/mL GOD** | 0.5 mL | 1 mL | 4℃ |

## 03 自备仪器与试剂

| 自备资源类型 | 资源名称 | 备注 |
|---|---|---|
| **仪器** | 具备动力学检测、温控功能及底板读数的荧光酶标仪 | 该实验需要在酶标仪内 37℃连续检测 120 min |
| **耗材** | 96 孔黑色透明底的细胞培养板 | 酶标仪读数为底板读数 |
| **试剂** | 与检测细胞相同的完全培养基 | 配制探针工作液 |
| **其他** | 离心机、调节式移液枪及枪头 | / |

## 04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。
- 该实验所用到的自备的完全培养基、Mineral Oil 均提前放在 37℃预温（最少放置 30 min）。
- 未使用完的 OCR-Probe 不能存放于-20℃，探针冻住后会导致检测值降低。
- 荧光酶标仪需要提前将温度预热至 37°C，检测过程建议维持检测环境稳定，避免晃动培养板。
- 加入 Mineral Oil 后请立即上机检测，避免体系与空气长时间接触导致溶解氧浓度变化。
- 加入 Mineral Oil 后酶标板放置在仪器中温度必须保持在 37℃恒定，且不能退板，酶标板在整个检测过程中全程放在仪器中孵育和检测。仪器振荡往往会造成结果的不稳定，不建议进行振荡。

## 05 实验流程

### 05-1 试剂准备

| 试剂名称 | 试剂准备 | 注意事项 |
|---|---|---|
| **OCR-Probe** | 即用型。 | 使用前恢复至室温（25℃）。未使用完的探针避光**存放于 4℃，不能存放于-20℃**。 |
| **Mineral Oil** | 即用型。 | 使用前加热到 37℃。 |
| **10 mM CCCP** | 用完全培养基稀释至 1 mM, 再根据实验需求进行稀释至所需浓度（板孔中终浓度 2-5 μM） | 使用前恢复至室温（25℃）。 |
| **100 U/mL GOD** | 即用型。 | 使用前恢复至室温（25℃）。 |
| **OCR-Probe Working Solution** | 用提前预热至 37℃的对应细胞完全培养基将 OCR-Probe 稀释 10-20 倍后使用。**（初步检测推荐先用预热好的培养基稀释 10 倍，不同的细胞系可先做预实验再根据实际情况进行稀释使用）** | 完全培养基使用前加热到 37℃。 |

### 05-2 实验步骤

#### 05-2-1 贴壁细胞实验步骤

1. 提前一天使用 96 孔黑色透底细胞培养板接种细胞，设置空白组、GOD 组、未处理组、药物组和阳性对照组（可选做），未处理组、药物组和阳性对照组中接种细胞，每孔细胞数量建议 5-15×$10^4$ 个，台盼蓝计数后细胞活率在 98%以上。空白组不接种细胞。建议未处理组、药物组和阳性对照组做 3 个复孔，空白组可做 2 个复孔，GOD 组可做 1 个孔。

**板孔设置说明：**

**① 空白组：板孔中无细胞，用于表示探针本身的荧光值大小。不参与最后结果计算。**

**② GOD 组：板孔中无细胞，加入 GOD 溶液，作为探针最大耗氧的对照，可直接说明探针检测耗氧是否有效。**

**③ 未处理组：板孔中接种细胞，用于检测基础氧消耗速率。**

**④ 药物组：板孔中接种细胞，加入待测药物，用于检测药物对细胞呼吸的影响。**

**⑤ 阳性对照组：板孔中接种细胞，加入用完全培养基稀释好的 CCCP，作为细胞氧消耗率的阳性对照。可选做。**

**注意：**

**① 药物组可根据自身实验需要进行设置，本试剂盒提供 CCCP 解耦联剂可在加入 OCR-Probe Working Solution 孵育之后加样直接检测，但其他药物需要根据自身模型实验进行设置加样时间。**

**A、若药物为 CCCP/FCCP、AntimycinA、Oligomycin、Rotenone 这些经典的线粒体呼吸链相关药物，可按照正常实验步骤进行（按照步骤 5 加药）。**

**B、对于非线粒体呼吸链相关的经典药物，可在步骤 3 之前进行加药处理，药物组在步骤 5 时加入 10 μL 预温好的完全培养基。**

**C、若是诱导细胞分化的药物，建议在接种前（步骤 1 之前）将细胞先进行诱导，再检测细胞 OCR 实验，药物组在步骤 5 时加入 10 μL 预温好的完全培养基。**

**② 具体细胞密度可根据细胞系不同进行摸索，建议先做细胞密度梯度的预实验，选择结果最好的细胞密度进行模型实验，以下为本试剂盒检测过的细胞密度范围，仅供参考：Hela 细胞 5-15×$10^4$ 个/孔、HEK293T 细胞 6-12×$10^4$ 个/孔 、HepG2 细胞 6-12×$10^4$ 个/孔。**

2. 所有试剂平衡至室温（25℃），在进行实验前，完全培养基和 Mineral Oil 需放置 37℃预温最少 30 min。酶标仪提前设置温度在 37℃，保证整个检测条件处于 37℃。

3. OCR-Probe Working Solution 配制：用提前预热至 37℃的对应细胞完全培养基将 OCR-Probe 稀释 10-20 倍后使用。

**注意：初步检测推荐先用预热好的培养基稀释 10 倍，不同的细胞系可先做预实验再根据实际情况进行稀释使用。**

4. 弃去上清，空白组、GOD 组、未处理组、药物组和阳性对照组（可选做）中，每孔加入 100 μL OCR-Probe Working Solution，将酶标板放置于预温好的酶标仪中 37℃孵育 10 min。

5. 空白组和未处理组中每孔加入 10 μL 预温好的完全培养基，阳性对照组（可选做）中每孔加入 10 μL 用完全培养基稀释的 CCCP（板孔中终浓度 2-5 μM，），药物组中每孔加入 10 μL 用完全培养基稀释后的药物。GOD 组加入 10μL 100 U/mL GOD 作为探针最大耗氧的对照，可直接说明探针检测耗氧是否有效。

**注意：若 GOD 组的初始值过高，可稀释后再加样。葡萄糖氧化酶 GOD 会消耗培养基中的溶解氧从而来直接说明探针检测细胞外溶解氧的敏感程度。**

6. 各孔加入 2 滴 37℃预热好的 Mineral Oil（可以用剪刀把枪头剪掉一部分吸取 100 μL 加样）后，立即将酶标板放入荧光酶标仪中，设置检测温度 37℃，激发波长 405 nm，发射波长 650 nm，底板读数，动力学模式检测 120 min，每 2-5 min 检测一次。

**注意：为了检测及时，建议提前设置好仪器的检测程序。加入 Mineral Oil 请立即上机检测，避免体系与空气长时间接触导致溶解氧浓度变化。若设置的板孔较多（大于 48 孔），部分仪器一次测完需要的时间大于 2 min，可将间隔时间延长到 5 min 测一次，建议不超过 5 min。**

**附贴壁细胞操作简表参考**

| | 空白组 | GOD 组 | 未处理组 | 药物组 | 阳性对照组 |
|---|---|---|---|---|---|
| **细胞接种量** | -- | -- | 5-15×$10^4$ cells/well | 5-15×$10^4$ cells/well | 5-15×$10^4$ cells/well |
| **OCR-Probe Working Solution** | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| **酶标板放置于预温好的酶标仪中 37℃孵育 10 min** | | | | | |
| **预温好的完全培养基** | 10 μL | -- | 10 μL | -- | -- |
| **用完全培养基稀释后的药物** | -- | -- | -- | 10 μL | -- |
| **用完全培养基稀释后的 CCCP（板孔中终浓度 2-5 μM)** | -- | -- | -- | -- | 10 μL |
| **100 U/mL GOD** | -- | 10 μL | -- | -- | -- |
| **Mineral Oil** | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL |

**板孔中加入 Mineral Oil 后，立即将酶标板放入荧光酶标仪中，设置检测温度 37℃，激发波长 405 nm，发射波长 650 nm，底板读数，动力学模式检测 120 min，每 2-5 min 检测一次。为了检测及时，建议提前设置好仪器的检测程序。加入 Mineral Oil 后请立即上机检测，避免体系与空气长时间接触导致溶解氧浓度变化。若设置的板孔较多（大于 48 孔），部分仪器一次测完需要的时间大于 2 min，可将间隔时间延长到 5 min 测一次，建议不超过 5 min。**

## 05-2-2 悬浮细胞实验步骤

1. 所有试剂平衡至室温（25℃），在进行实验前，完全培养基和 Mineral Oil 需放置 37℃预温最少 30 min。酶标仪提前设置温度在 37℃，保证整个检测条件处于 37℃。

2. OCR-Probe Working Solution 配制：用提前预热至 37℃的对应细胞完全培养基将 OCR-Probe 稀释 10-20 倍后使用。

**注意：初步检测推荐先用预热好的培养基稀释 10 倍，不同的细胞系可先做预实验再根据实际情况进行稀释使用。**

3. 离心收集细胞，弃上清，使用 OCR-Probe Working Solution 重悬细胞，每管细胞浓度约为 **5-10×$10^6$ 个/mL。**

**注意：具体细胞密度可根据细胞系不同进行摸索，建议先做细胞密度梯度的预实验，选择结果最好的细胞密度进行模型实验，以下为本试剂盒检测过的细胞密度范围，仅供参考：Jurkat 细胞 5-10×$10^6$ 个/mL，加入 100μL 到板孔中的细胞浓度为 5-10×$10^5$ 个/孔。**

4. 黑色透底酶标板设置空白组、GOD 组、未处理组、药物组和阳性对照组（可选做）。空白组、GOD 组中加入 100 μL OCR-Probe Working Solution。未处理组、药物组和阳性对照组（可选做）中每孔加入 100 μL 用 OCR-Probe Working Solution 重悬的细胞悬液**（约 5-10×$10^5$ 个/孔）**，将酶标板放置于酶标仪中 37℃避光孵育 10 min。建议未处理组、药物组和阳性对照组做 3 个复孔，空白组可做 2 个复孔，GOD 组可做 1 个孔。

**板孔设置说明：**

**① 空白组：板孔中无细胞，用于表示探针本身的荧光值大小。不参与最后结果计算。**

**② GOD 组：板孔中无细胞，加入 GOD 溶液，作为探针最大耗氧的对照，可直接说明探针检测耗氧是否有效。**

**③ 未处理组：板孔中接种细胞，用于检测基础氧消耗速率。**

**④ 药物组：板孔中接种细胞，加入待测药物，用于检测药物对细胞呼吸的影响。**

**⑤ 阳性对照组：板孔中接种细胞，加入用完全培养基稀释好的 CCCP，作为细胞氧消耗率的阳性对照。可选做。**

**注意：**

**药物组可根据自身实验需要进行设置，本试剂盒提供 CCCP 解耦联剂可在用 OCR-Probe Working Solution 重悬细胞孵育之后加样直接检测，但其他药物需要根据自身模型实验进行设置加样时间。**

**A、若药物为 CCCP/FCCP、AntimycinA、Oligomycin、Rotenone 这些经典的线粒体呼吸链相关药物，可按照正常实验步骤进行（按照步骤 5 加药）。**

**B、对于非线粒体呼吸链相关的经典药物，可在步骤 3 之前进行加药处理，药物组在步骤 5 时加入 10 μL 预温好的完全培养基。**

**C、若是诱导细胞分化的药物，建议在悬浮细胞检测 OCR 实验之前将细胞先进行诱导，再检测细胞 OCR 实验，药物组在步骤 5 时加入 10 μL 预温好的完全培养基。**

5. 空白组和未处理组中每孔加入 10 μL 预温好的完全培养基，阳性对照组（可选做）中每孔加入 10 μL 用完全培养基稀释的 CCCP（板孔中终浓度 2-5 μM），药物组中每孔加入 10 μL 用完全培养基稀释后的药物。GOD 组加入 10μL 100 U/mL GOD 作为探针最大耗氧的对照，可直接说明探针检测耗氧是否有效。

**注意： 若 GOD 组的初始值过高，可稀释后再加样。葡萄糖氧化酶 GOD 会消耗培养基中的溶解氧从而来直接说明探针检测细胞外溶解氧的敏感程度。**

6. 各孔加入 2 滴 37℃预热好的 Mineral Oil（可以用剪刀把枪头剪掉一部分吸取 100 μL 加样）后，立即将酶标板放入荧光酶标仪中，设置检测温度 37℃，激发波长 405 nm，发射波长 650 nm，底板读数，动力学模式检测 120 min，每 2-5 min 检测一次。

**注意：为了检测及时，建议提前设置好仪器的检测程序。加入 Mineral Oil 请立即上机检测，避免体系与空气长时间接触导致溶解氧浓度变化。若设置的板孔较多（大于 48 孔），部分仪器一次测完需要的时间大于 2 min，可将间隔时间延长到 5 min 测一次，建议不超过 5 min。**

**附悬浮细胞操作简表参考**

| | 空白组 | GOD 组 | 未处理组 | 药物组 | 阳性对照组 |
|---|---|---|---|---|---|
| **细胞量** | -- | -- | 5-10×$10^5$ cells/well | 5-10×$10^5$ cells/well | 5-10×$10^5$ cells/well |
| **OCR-Probe Working Solution** | 100 μL | 100 μL | -- | -- | -- |
| **用 OCR-Probe Working Solution 重悬的细胞悬液** | -- | -- | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| **酶标板放置于预温好的酶标仪中 37℃孵育 10 min** | | | | | |
| **预温好的完全培养基** | 10 μL | -- | 10 μL | -- | -- |
| **用完全培养基稀释后的药物** | -- | -- | -- | 10 μL | -- |
| **用完全培养基稀释后的 CCCP（板孔中终浓度 2-5 μM)** | -- | -- | -- | -- | 10 μL |
| **100 U/mL GOD** | -- | 10 μL | -- | -- | -- |
| **Mineral Oil** | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL | 2 滴/100 μL |

**板孔中加入 Mineral Oil 后，立即将酶标板放入荧光酶标仪中，设置检测温度 37℃，激发波长 405 nm，发射波长 650 nm，底板读数，动力学模式检测 120 min，每 2-5 min 检测一次。为了检测及时，建议提前设置好仪器的检测程序。加入 Mineral Oil 后请立即上机检测，避免体系与空气长时间接触导致溶解氧浓度变化。若设置的板孔较多（大于 48 孔），部分仪器一次测完需要的时间大于 2 min，可将间隔时间延长到 5 min 测一次，建议不超过 5 min。**

## 05-3 结果计算

1. 对各组的复孔荧光检测值求取平均值，以荧光值为纵坐标、时间（min）为横坐标绘制曲线。

2. 找出并选取曲线中线性最好的区间，做线性回归拟合。回归得到拟合方程的斜率即为 OCR，单位为 RFU/min（Relative Fluorescence Units/ min）。

## 06 结果示例

1. 提前一天使用 96 孔黑色透底细胞培养板接种 Hela 细胞，设置空白组、GOD 组、未处理组、阳性对照组和药物组，未处理组、阳性对照组和药物组中接种 Hela 细胞，每孔细胞数量为 5×$10^4$ 个，台盼蓝计数后细胞活率在 98%以上。空白组不接种细胞。未处理组、阳性对照组和药物组做 3 个复孔，空白组做 2 个复孔，GOD 组做 1 个孔。

2. 所有试剂平衡至室温（25℃），在进行实验前，完全培养基和 Mineral Oil 需放置 37℃预温 60 min。酶标仪提前设置温度在 37℃，保证整个检测条件处于 37℃。

3. OCR-Probe Working Solution 配制：用提前预热至 37℃的 DMEM 完全培养基将 OCR-Probe 稀释 10 倍。

4. 弃去上清，空白组、GOD 组、未处理组、阳性对照组（CCCP）和药物组（Antimycin A）中，每孔加入 100 μL Probe Working

Solution，将酶标板放置于酶标仪中 37℃避光孵育 10 min。

5. 空白组和未处理组中每孔加入 10 μL 预温好的完全培养基，阳性对照组中每孔加入 10 μL 用完全培养基稀释的 CCCP（板孔中终浓度 2 μM），药物组中每孔加入 10 μL 用完全培养基稀释的 Antimycin A（板孔中终浓度 1 μM）。GOD 组加入 10μL 100 U/mL GOD 作为探针最大耗氧的对照，可直接说明探针检测耗氧是否有效。

6. 对各组的复孔荧光检测值求取平均值，以荧光值为纵坐标、时间（min）为横坐标绘制曲线。如 Figure 1 所示。

7. 找出并选取曲线的线性区间，做线性回归计算斜率，如 Figure 2 所示。回归得到的斜率即为 OCR，单位为 RFU/min（Relative Fluorescence Units/ min），如 Figure 3 所示。

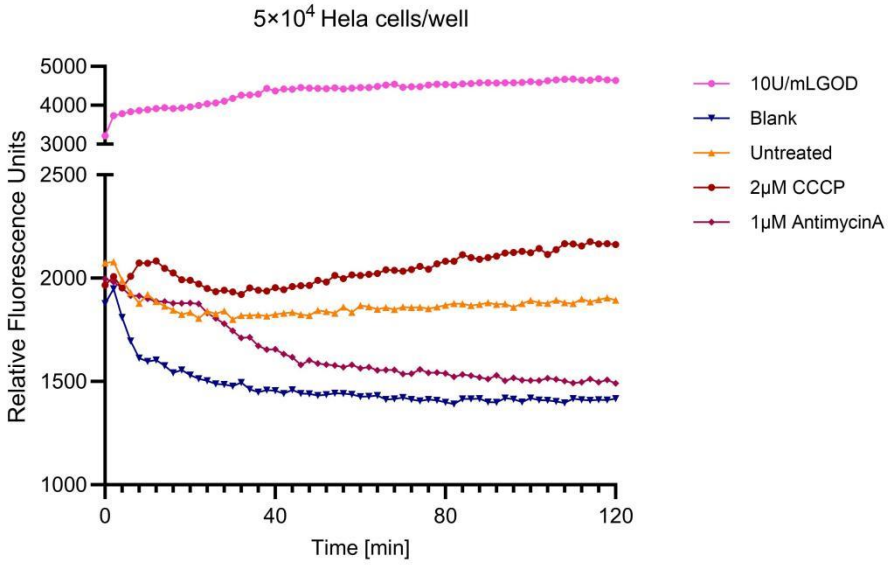



Figure 1. Hela 细胞外耗氧的动力学曲线图。

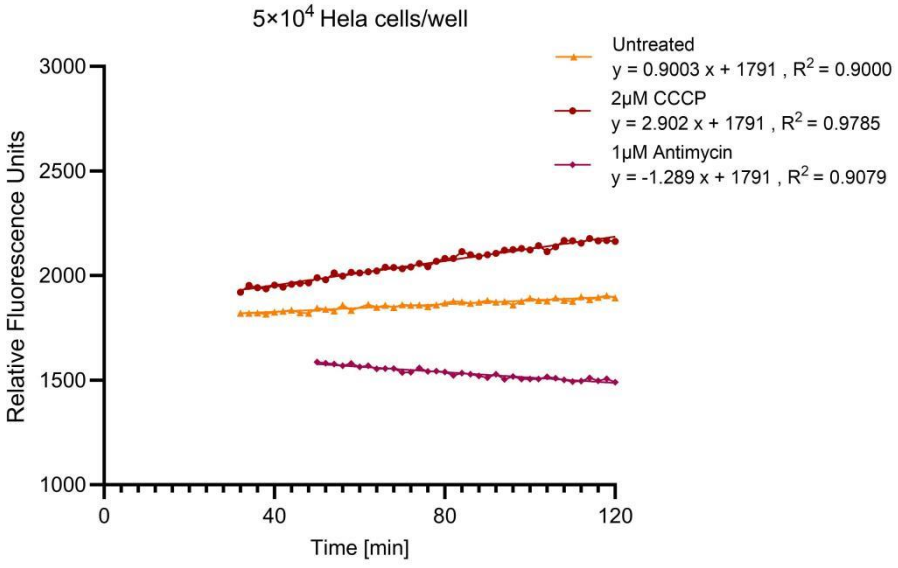



Figure 2.Hela 细胞外耗氧的动力学曲线中荧光值随时间呈线性的回归拟合图

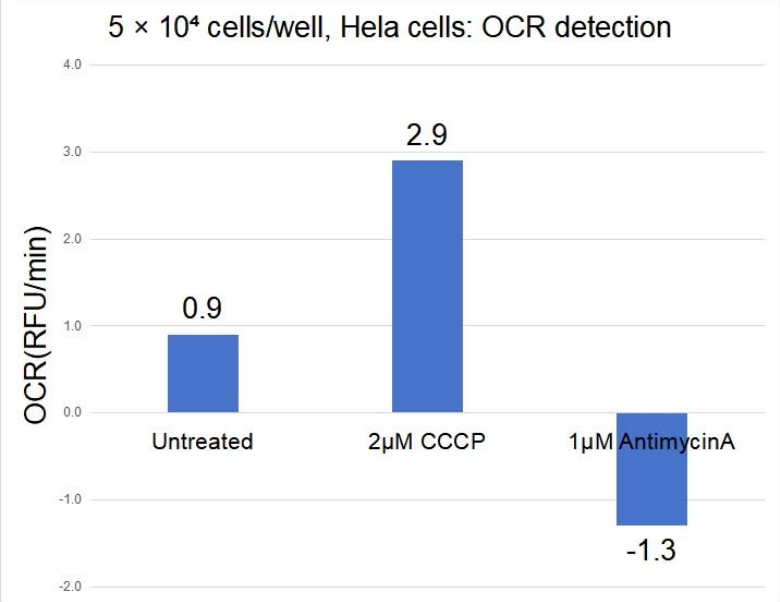



Figure 3.Hela 细胞 OCR 值各组对比

## 07 FAQ

**1. 检测结果未处理组没有趋势?**

可能存在下面的原因:

①细胞数量太少及细胞状态不好。

细胞在进行实验之前需要进行台盼蓝计数，细胞活率要在在 98%以上。在 96 孔板中接种的细胞在显微镜下观察时呈融合状态。若发现细胞间有空隙，说明细胞数量太少，需要增加细胞接种量。

②检测时的温度没有恒定在 37℃

加入 Mineral Oil 后酶标板放置在仪器中温度必须保持在 37℃恒定，且不能退板，酶标板在整个检测过程中全程放在仪器中孵育和检测。 仪器振荡往往会造成结果的不稳定，不建议进行振荡。

③检查试剂是否提前放到 37℃预温，在实验前，应该把完全培养基和 Mineral Oil 放到 37℃预温最少 30 min，酶标仪在检测前需要提前设置温度到 37℃。酶标板孵育建议放在酶标仪中进行孵育，不建议放到 37℃恒温箱中孵育。

**2. 可以使用无血清的基础培养基吗?**

建议使用含血清的完全培养基进行实验，无血清培养基与含血清的培养基相比，荧光值往往会偏低。若要比较结果，请务必在每次实验中使用相同的培养基条件。

**3. 试剂盒中的药物 CCCP 等对于细胞氧消耗率 OCR 有何影响?**

细胞氧化磷酸化常用干预药物主要包括 CCCP/FCCP、抗霉素 A（Antimycin A）等。CCCP 与 FCCP 为经典氧化磷酸化解偶联剂，可耗散线粒体内膜跨膜质子梯度，解除电子传递与 ATP 合成的偶联关系；药物处理后细胞线粒体电子传递不受阻断，耗氧速率上升，因此细胞 OCR 显著升高。Antimycin A 属于线粒体呼吸链复合体Ⅲ抑制剂，能够阻断线粒体电子传递链，直接抑制线粒体呼吸功能，给药后细胞 OCR 明显下降。

**4. OCR 检测中，是否可将多种药物加入同一检测孔进行分析?**

不可以。本试剂盒检测体系要求单孔仅添加一种受试药物，不支持同一孔内多种药物混合给药来检测细胞耗氧状态。如需评价多种药物对细胞 OCR 的作用，需分别设置独立的药物处理孔开展平行检测。

## 08 相关产品

| 货号 | 试剂盒名称 |
| --- | --- |
| KTA9011 | 细胞外酸化率(ECAR)检测试剂盒 |
| KTA9012 | 线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD) |
| KTA4001 | 线粒体膜电位分析试剂盒(JC-1 法) |

# 氧消耗率(OCR)检测试剂盒

（Abbkine 货号 ： KTA9010）

## 一 样本处理

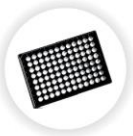
未处理组、药物组和阳性对照组将细胞接种于 96 孔全黑透底细胞培养板中，每孔接种 100 μL 细胞（建议接种 5-15×10⁴个 / 孔）。空白组不接种细胞。

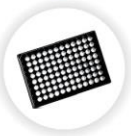
贴壁细胞

悬浮细胞

1000rpm离心5min弃上清
每管用Probe Working Solution重悬细胞(每管细胞浓度约为5-10×10⁶个/mL)

空白组、GOD组、未处理组、药物组、阳性对照组每孔加入100 μL Probe Working Solution





96孔全黑透底细胞培养板中，未处理组、药物组和阳性对照组每孔加入100μL细胞悬液。空白组、GOD组加入100μLProbe Working Solution

**Probe Working Solution配制：**

用提前预热至37℃的对应细胞的完全培养基稀释10-20倍后使用

(初步检测推荐先用预热好的培养基稀释10倍，不同的细胞系可先做预实验再根据实际情况进行稀释使用)

在预热好的荧光酶标仪中
37℃孵育10 min

## 二 样本检测

空白组和未处理组每孔加入 10μL 预温好的完全培养基
药物组每孔加入 10μL 用完全培养基稀释后的药物
阳性对照组(可选做)中每孔加入 10μL 用完全培养基稀释的 CCCP(板孔中终浓度 **2-5 μM**)
GOD 组加入 10μL **100U/mL GOD**
各孔加入 2 滴 37℃预热好的 Mineral Oil(可以用剪刀把枪头剪掉一部分吸取 100 μL 加样)后，立即放入荧光酶标仪中

板孔中加入**Mineral Oil**后，立即将酶标板放入荧光酶标仪中，设置检测温度37℃，激发波长405 nm，发射波长650 nm，底板读数，动力学模式检测120 min，每2-5 min检测一次。为了检测及时，建议提前设置好仪器的检测程序，为了检测及时，建议提前设置好仪器的检测程序。加入**Mineral Oil**后请立即上机检测，避免体系与空气长时间接触导致溶解氧浓度变化。若设置的板孔较多（大于48孔），部分仪器一次测完需要的时间大于2min，可将间隔时间延长到5 min测一次，建议不超过5 min。

V1.0