

安捷伦 Seahorse XF Pro 实验操作手册





Seahorse XF Pro 实验用试剂盒、培养基、耗材板	3
培养基金的资源。	3
耗材板	3
安捷伦 Seahorse XF 技术简介	4
XF Cell Mito Stress Test Kit(线粒体压力测试)	5
XF Glycolytic Rate Assay Kit(糖酵解速率测定)	6
Seahorse XF Pro 实验操作流程图	7
A. 实验前一天 — 准备工作	8
B. 实验当天 — 上机检测	10
Seahorse XF 实验常见问题及解答(附 1)	18
Seahorse XF 技术常用资源网址(附 2)	21

Seahorse XF Pro 实验用试剂盒、培养基、耗材板

订购货号	产品说明	产品内容
103015-100	Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒	6包
103344-100	Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒	6包
103020-100	Seahorse XF 糖酵解压力测试试剂盒	6包
103672-100	Seahorse XF 长链脂肪酸氧化压力测试试剂盒	3包
103673-100	Seahorse XF 葡萄糖/丙酮酸氧化压力测试试剂盒	3包
103674-100	Seahorse XF 谷氨酰胺氧化压力测试试剂盒	3包
103693-100	Seahorse XF 棕榈酸氧化压力测试试剂盒	包含一个 103672-100、102720-100 和左旋肉碱
103592-100	Seahorse XF 实时 ATP 速率测定试剂盒	6包
103772-100	Seahorse XF T 细胞代谢分析试剂盒	6 包,检测 T 细胞持久性和 T 细胞代谢适应性
103759-100	Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒	2 个 96 孔板的全板分析
103595-100	Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒	6包
102720-100	Seaborse XE 棕榈酸-BSA FAO 底物	3×3mL 棕榈酸-BSA
1027201100	Seanoise XI 100100 DOA FAO 10010	3×3 mL BSA 对照
103766-100	Seahorse XF Hu T 细胞活化测定 96 孔板套装	200 次测试

培养基

订购货号	产品说明	产品内容
103575-100	Seahorse XF DMEM 培养基,pH 7.4,500 mL	无酚红,无需调 pH
103576-100	Seahorse XF RPMI 培养基,pH 7.4,500 mL	无酚红,无需调 pH
103577-100	Seahorse XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液,50 mL	用于配制检测液
103578-100	Seahorse XF 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液,50 mL	用于配制检测液
103579-100	Seahorse XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液,50 mL	用于配制检测液
103335-100	Seahorse XF 基础培养基,500 mL	不含酚红
103680-100	Seahorse XF DMEM 检测液套装,pH 7.4	包含 103575-100、103577-100、103578-100、103579-100 各一个
103681-100	Seahorse XF RPMI 检测液套装,pH 7.4	包含 103576-100、103577-100、103578-100、103579-100 各一个

耗材板

订购货号	产品说明	产品内容
103775-100	Seahorse XF Pro M FluxPak	18 块 96 孔探针板,18 块 XF Pro M 细胞培养微孔板,1 瓶校准液
103777-100	Seahorse XF Pro M FluxPak Mini	6 块 96 孔探针板,6 块 XF Pro M 细胞培养微孔板,1 瓶校准液
103792-100	Seahorse XFe96/XF Pro FluxPak	18 块 96 孔探针板,18 块 XFe96/XF Pro 细胞培养微孔板,1 瓶校准液
103793-100	Seahorse XFe96/XF Pro FluxPak Mini	6 块 96 孔探针板,6 块 XFe96/XF Pro 细胞培养微孔板,1 瓶校准液
102905-100	Seahorse XFe96 细胞球体 FluxPak	6 块 XFe96 探针板,6 块 XFe96 细胞球体微孔板
103774-100	Seahorse XF Pro M 微孔板	6 块 XF Pro M 细胞培养微孔板
102959-100	Seahorse XFe96 细胞球体微孔板	1 块聚苯乙烯板
102978-100	Seahorse XFe96 细胞球体微孔板	6 块聚苯乙烯板
103794-100	Seahorse XFe96/XF Pro 微孔板	6 块 XFe96/XF Pro 细胞培养微孔板
103798-100	Seahorse XFe96/XF Pro PDL FluxPak Mini	6 块 96 孔探针板,6 块 XFe96/XF Pro PDL 细胞培养微孔板
103799-100	Seahorse XFe96/XF Pro PDL 细胞板	6 块 XFe96/XF Pro PDL 细胞培养微孔板

安捷伦 Seahorse XF 技术简介

一. 细胞能量代谢简述

哺乳动物细胞有两条关键的能量代谢通路,即有氧呼吸和糖酵解。有氧呼吸主要在线粒体中进行,该过程消耗氧气驱动细胞将营养底物(糖、脂、蛋白质)氧化分解并释放出能量合成大量ATP,因此线粒体又被称为细胞的"能量工厂"。糖酵解发生在细胞质基质中,是一种无氧分解过程,细胞中的葡萄糖转变为丙酮酸并产生少量 ATP,丙酮酸在细胞质基质中转变为乳酸,或者在线粒体中转变为 CO₂ 和水。糖酵解和氧化磷酸化是细胞中两条关键的能量产生途径。大多数细胞具有在这两条途径之间切换的能力,从而适应环境的变化。

二.测量细胞能量代谢的重要性

"人是铁,饭是钢,细胞活动需能量",能量代谢驱动细胞功能,在各种关键的细胞过程中发挥重要作用,多个领域的科学家正在应用 XF 技术检测细胞代谢研究相关功能,包括癌症、免疫学、肥胖、免疫肿瘤学、药物研发或筛选、糖尿病、干细胞、心血管功能、神经退行性疾病、病毒学和衰老等。

癌症研究人员将氧化磷酸化到糖酵解的代谢转换视为癌症的标志;免疫学研究人员将代谢重编程确定为固有免疫的关键标志;肥胖、糖尿病和代谢紊乱则与不同细胞代谢表型相关联;干细胞研究可利用 XF 技术来改善干细胞科学各方面的效率和结果;神经生物学研究人员发现代谢转换与神经退行性疾病之间存在很强的相关性......

三. 安捷伦 Seahorse XF 能量代谢检测技术简介

XF 技术是依托 Seahorse XF 能量代谢检测系统,利用专门设计的非侵入、无标记式传感器,同时、实时测量活细胞的两条能量代谢通路,量化细胞代谢表型,从而分析细胞功能的变化。XF 实验通过测定氧气消耗速率 (Oxygen Consumption Rate, OCR) 来反映细胞线粒体的功能,通过测定细胞外酸化速率 (Extra cellular acidification rate, ECAR)、质子流出速率 (Proton Efflux Rate, PER) 来反映糖酵解功能。

目前,安捷伦提供 3 种 XF 分析系统,分别是 XF Pro 分析仪(96 孔形式)、XFe24 分析仪(24 孔 形式)、HS Mini 分析仪(8 孔形式),三款仪器均可检测贴壁细胞、悬浮细胞(传代细胞或原代细 胞)和分离线粒体的能量代谢。其中,XF Pro 分析仪可使用 Seahorse XF 细胞球体板检测 3D 细胞 球的能量代谢;XFe24 分析仪可使用 Seahorse XF 胰岛捕获板检测组织类样本(如胰岛、脑组织、 骨骼肌纤维、脂肪组织、斑马鱼胚胎、线虫、果蝇、拟南芥等等)的能量代谢;HS Mini 分析仪可 使用 HS 迷你板用于数量有限的原代细胞、呼吸作用弱的细胞类型及 T 细胞亚群等,XF HS 迷你板 所提供的微室较小,孔底面积为 3.05 mm²,与 XFp 迷你板相比,使用 1/3 的细胞即可产生可靠的检 测信号,使其成为生物样本有限研究的理想选择。因此,可选择合适的平台满足特定的科研需求。

此外,安捷伦还提供了经过校验及质量验证的各类试剂盒与试剂,满足细胞代谢的检测,下面内容列出了两种最常用试剂盒的原理(其他试剂盒请参考试剂盒用户指南)。

XF Cell Mito Stress Test Kit(线粒体压力测试)

线粒体压力测试实验通过依次加入线粒体电子传递链 (ETC) 的靶向药物测量细胞的氧气消耗速率 (OCR) 而得到反映线 粒体功能的关键参数,包括 basal respiration、ATP-linked respiration、proton leak、maximal respiration、spare respiratory capacity 和 non-mitochondrial oxygen consumption。



该实验使用的药物为 Oligomycin、FCCP、Rotenone & antimycin A,加入顺序及 ETC 靶点如附图,以下为药物的 原理解释:

Oligomycin (寡霉素): 该药物抑制 ATP 合酶(即复合物 V),在测量细胞基础呼吸后第一个加入,该药可以影响或降低通过 ETC 的电子流,引起线粒体呼吸或 OCR 减少,这部分减少的 OCR 与细胞 ATP 合成相关。

FCCP (Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy)

Phenylhydrazone, 羰基氰对三氟甲氧基苯腙): 该药在 oligomycin 后加入, 是一种解偶联剂, 加入该药会破坏质 子梯度和线粒体膜电位, 引起电子在 ETC 不受限制地传 递, 同时复合物 IV 的耗氧达到最大。FCCP 刺激的 OCR 可被用来计算细胞备用呼吸能力(该值为最大呼吸与基础 呼吸的差异), 备用呼吸能力代表细胞对能量需求增加或 在压力下作出反应的能力。

Rotenone&antimycin A(鱼藤酮/抗霉素 A): 第三次加入的药物,是 rotenone 和 antimycin A 的混合物。Rotenone 是复合物 I 的抑制剂, antimycin A 是复合物 III 的抑制剂。这两种药物可关闭线粒体呼吸,从而能够计算出由线粒体外活动所驱动的非线粒体呼吸耗氧。



Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile

基础呼吸 (Basal respiration):用于满足细胞的 ATP 需求和 质子渗漏的耗氧。代表细胞在基线状态下的能量需求。

ATP 相关联呼吸 (ATP-linked respiration):加入 ATP 合酶 抑制剂寡霉素后减少的氧气消耗速率,代表基础呼吸中被 用来驱动 ATP 产生的部分。表示用来满足细胞能量需求的 线粒体 ATP 产生。

质子渗漏 (Proton leak):基础呼吸减去 ATP 相关呼吸的剩 余耗氧,该部分氧气消耗未偶联 ATP 合成。质子渗漏可作 为线粒体损伤的标志,也可被看作是一种调节线粒体 ATP 产生的机制。

最大呼吸 (Maximal respiration): 加入解偶联剂 FCCP 之 后获得的最大氧气消耗速率。FCCP 通过刺激呼吸链以最 大能力运转模拟生理的 "能量需求",导致底物 (糖、脂 肪和氨基酸)的快速氧化以应对这一代谢挑战。显示细胞 能够达到的最大呼吸速率。

备用呼吸能力 (Spare respiratory capacity):最大呼吸减去 基础呼吸的耗氧。代表细胞对能量需求的潜在响应能力以 及细胞基础呼吸与理论呼吸最大值间的差距,细胞响应需 求的能力可作为细胞适应性或灵活性的指标。

非线粒体氧消耗 (Non-mitochondrial oxygen consumption): 加入鱼藤酮和抗霉素 A 后,由于一部分细胞中的酶继续消耗 氧而存留的氧消耗。这对于线粒体呼吸的准确测量很重要。

XF Glycolytic Rate Assay Kit (糖酵解速率测定)

安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定是一种准确可靠的分 析方法,用于测量细胞糖酵解。可准确测量基础糖酵解速 率和线粒体被抑制后的补偿性糖酵解速率。通过计算并减 去线粒体/TCA 循环来源的 CO。对细胞外酸化的贡献,所 得到的糖酵解速率与乳酸累积数据具有直接的可比性。

细胞中的能量有两条产生途径: 糖酵解和线粒体呼吸。在 糖酵解途径中,葡萄糖分解为乳酸时,质子被排到细胞 外培养基中,这可通过 XF 分析仪检测到,称为 ECAR。 另外,线粒体 TCA 活动产生 CO₂,后者水合后使培养基 酸化。在实验过程中,通过采用线粒体复合物 | 和复合物 III 抑制剂 (Rot/AA) 来抑制呼吸 (OCR),可计算呼吸来源 的质子流出速率,并将其从总的质子流出速率中减去,得 到 glycoPER。为了证实通路特异性,加入糖酵解抑制剂 2-DG,抑制糖酵解酸化。







注: 活细胞的质子流出包括糖酵解和线粒体来源的酸化。通过鱼藤酮和抗 霉素 A (Rot/AA) 抑制线粒体功能能够计算出线粒体相关的酸化。总的质子 流出速率减去线粒体的酸化,即得到糖酵解质子流出速率。

糖酵解 (Glycolysis): 对于 Seahorse XF 糖酵解速率测定而 言, 指葡萄糖转变为乳酸的过程。

缓冲系数 (Buffer Factor, BF):测量系统的缓冲能力,包括 检测液和 XF 实验条件(仪器、传感器、实验耗材)。

质子流出速率 (Proton Efflux Rate, PER): 细胞在一段时间 内释放到检测液中的质子数,用 pmol/min 表示。

糖酵解质子流出速率 (Glycolytic Proton Efflux Rate, alvcoPER):来自糖酵解的质子流出速率(减去 CO2 酸化的 影响)。该测量结果与细胞外乳酸产生速率高度相关。

补偿性糖酵解 (Compensatory Glycolysis):加入线粒体 抑制剂后的细胞糖酵解速率,有效抑制了氧化磷酸化, 驱动细胞进行补偿性改变,利用糖酵解来满足细胞的能 量需求。

加入 2-DG 后的酸化 (Post-2-DG Acidification): 该值包括 其他来源的细胞外酸化,不是由糖酵解或线粒体 TCA 活动 产生的, 也包括未被 2-DG 完全抑制的剩余糖酵解。在糖 酵解速率测定流程中加入 2-DG 后进行测量。

诱导实验 (Induced Assay): 在加入 XF 糖酵解速率测定化 合物之前,加入某种待测化合物的实验流程。该流程可实 时、原位、定量测定糖酵解激活或抑制作用。

Seahorse XF Pro 实验操作流程图



A. 实验前一天 — 准备工作

一. 开启并预热检测系统

- 1. 按下 Seahorse XF Pro 仪器背后的开关开启仪器主机
- 2. 按下 Seahorse XF Pro Controller (控制电脑) 右侧边开 关开启控制器
- 3. 打开软件 Wave Pro Controller,等待控制器与仪器主机 连接成功,并升温至 37 ℃ (图 A-Figure1.1)

注: 让仪器充分预热至少 1-2 小时(建议过夜),并平衡至设定温度。如 果起始环境温度条件为0℃以下,则仪器需平衡至室温 24 小时



A-Figure1.1.

二. 接种贴壁细胞(B 实验当天操作部分附有悬浮细 胞接种方法)

(一)、XFp 细胞培养迷你板

Seahorse 96 孔细胞培养板每孔的接种面积为 11.40 mm², 约为普通 96 孔细胞培养板每孔接种面积的 40%。在接种 细胞之前,应先确定细胞最佳接种密度,不同类型细胞的 最佳接种密度不同,通常在 5-40 K/well 范围内优化。请 注意对于部分细胞系,需要根据培养该细胞经验确定优化 范围。

如果使用 Seahorse XFe96/XF Pro 细胞板,参考以下接种 流程(图 A-Figure 2.1)。



A-Figure 2.1. 接种贴壁细胞基本流程

接种贴壁细胞的详细流程:

- 1. 在超净工作台中打开包装, 取出 XFe96 细胞培养板
- 在 XFe96/XF Pro 细胞培养板背景校正孔(如图 A-Figure2.2 灰色孔: A1、A12、H1、H12)中加入 80 μL 细胞生长培养基,勿加入细胞



A-Figure 2.2. XFe96/XF Pro 细胞培养板背景校正孔分布

- 将培养的细胞收集(尽量在不损伤细胞的前提下吹散细胞),计算细胞密度配制细胞悬液,按 80 μL 接种体积 计算密度(如接种 10K cells/well,则细胞悬液密度为 10K cells/80 μL/well = 125K cells/mL)
- 4. 在 XFe96/XF Pro 细胞培养板除背景校正孔外的每孔中 接种 80 μL 细胞悬液(可参考图 A-Figure2.2 操作,接 种细胞时注意移液枪头位置)
- 5. 将细胞培养板于超净工作台中静置 1 h 使细胞自然沉降,这有助于细胞均匀分布并降低某些细胞类型的边缘效应(请注意这一步很重要,细胞接种完毕勿移动细胞培养板,盖上盖子使其直接进入静置状态)
- 将细胞培养板放入 37 °C CO₂ 细胞培养箱中以使细胞贴 壁并过夜培养(注:细胞培养时间根据实验需求可能有 所不同),上机前细胞汇合度需达到 50%-90%(建议细 胞汇合度达到 80%-90% 左右为最佳)

注:将细胞培养板放入培养箱时保持水平,并避免晃动以免已(刚)沉降 的细胞分布不匀

如果使用 Seahorse XF Pro M 细胞板,参考以下接种流程。



A-Figure 2.3. 使用 Seahorse XF Pro M 细胞板接种贴壁细胞基本流程

- 收集细胞并将其重悬至所需的最终浓度,以便接种至 80 µL 生长培养基中。单细胞悬浮液非常利于产生一致 的细胞单层,在接种前最好分散聚集的细胞。在计数和 接种至 XF Pro M 细胞培养微孔板之前确保细胞完全重 新悬浮,这一点也很重要
- 如 A-Figure 2.3 所示,每孔接种 80 µL 细胞悬浮液(细胞/孔)。移液枪头应保持 45 度角左右,大约伸到孔壁的中部,并与孔壁接触(A-Figure 2.4)。对于所有孔,移液器应保持相同的角度。无需在背景校正孔(A1、A12、H1、H12)中接种细胞



A-Figure 2.4. 将细胞分液至 Seahorse XF Pro M 细胞板的正确移液技术

- 3. 仅向背景校正孔中添加培养基(无细胞)
- 4. 向每个凹槽孔(共4个)中添加 1.0 mL 细胞培养级水。
 将 8 通道移液器设置为 250 µL,一次性移液到两个孔中,可实现这一操作。如图 A-Figure 2.5 所示,向平行于第 1 列和第 12 列的凹槽孔中移液,填充所有 4 孔

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	- A													
	- B													
每个	- c													
移液器	D													
通道 250 µL	- E													
水	- F													
	- G													
	н													



- 5. 重要提示: 在室温下将板在超净工作台中放置一小时
- 6. 放置一小时后,将接种有细胞的微孔板转移至湿度适宜 的 37 ℃ CO₂ 培养箱中。在转移过程中,请勿倾斜或摇 晃微孔板,以免凹槽孔中的水洒出
- 7. 让细胞在组织培养箱中过夜生长。使用显微镜监测细胞 的生长和健康状况

三.水化探针板-1

- 1. 打开 Seahorse XFe96/XF Pro 细胞外流量分析试剂盒并 取出其中的内容物
- 2. 将探针板倒置于工具板旁边
- 3. 向工具板的每个孔中加入 200 µL XF 校准液
- 将 XF 水化辅助板置于工具板顶部,并向下按压 XF 水 化辅助板,确保与工具板紧密组装在
- 5. 将传感器探针板透过 XF 水化辅助板的开口降低到工具 板上,使探针浸入 XF 校准液中(图 A-Figure 3.1)



A-Figure 3.1. 安捷伦 Seahorse XF Pro 水化辅助板与 安捷伦 Seahorse XFe96/XF Pro 探针板和工具板的组装

- 6. 确定 XF 校准液面高度能否使探针保持浸没状态
- 7. 在 37 ℃ 下置于无 CO₂ 培养箱中放置过夜。为防止 XF 校准液蒸发,培养箱应进行加湿处理

B. 实验当天 – 上机检测

一.水化探针板-2

- 1. 从培养箱中取出与 XF 水化辅助板和工具板组装的探针板
- 2. 将探针板倒置于工具板旁边
- 3. 用一只手稳稳扶住工具板,用另一只手从一个角抬起 XF 水化辅助板,将其取下
- 将探针板放回工具板上,并按要求将化合物上样至加药口,置于 XF Pro 分析仪进行校准

注:探针板加药操作详见 B. 实验当天 — 上机检测 四. 配药并将药物加入 探针板加药孔 (port) 中

二. 配制 Seahorse 检测液

Seahorse XF 检测液主要包含基础培养基和待添加的营养 底物 (glucose、glutamine、pyruvate),而添加底物的种类 在不同实验中有差异(添加底物的种类请阅读试剂盒说明 书,并且底物浓度可参照说明书或加入与细胞生长培养基 中相同的浓度)。

本部分内容主要介绍两种检测液的配制方法,即无需调 pH 的检测液和需要调 pH 的检测液,用户可根据需要选择并 购买相应试剂。

注:本部分内容均以 103015-100 Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit 举例,且检测液中底物浓度为 1 mM pyruvate、2mM glutamine 和 10 mM glucose

★ 无需调 pH 的检测液配制方法

请准备以下物品:

- 103575-100Seahorse XF DMEM Medium, pH 7.4 或 103576-100 Seahorse XF RPMI Medium, pH 7.4
- 103577-100 Seahorse XF 1.0 M Glucose Solution
- 103578-100 Seahorse XF 100 mM Pyruvate Solution
- 103579-100 Seahorse XF 200 mM Glutamine Solution (注: -20 °C 保存)

配制方法:

 从 103575-100 或 103576-100 中分装出 97 mL(超 净台中进行),向其中分别加入 1 mL glucose、1 mL pyruvate、1 mL glutamine 混匀,则配好了检测液(添 加底物的体积可根据实验所需浓度调整) 将配好的检测液放入 37 °C 无 CO₂ 的细胞培养箱中温育 备用(或 37 °C 水浴后直接使用)

注:

- a) 检测液需现用现配,勿一次性配太多 (Glutamine 需新鲜)
- b) 对于一块细胞培养板的检测,100 mL 检测液是足够的
- c) 103575-100 Seahorse XF DMEM Medium, pH 7.4 或 103576-100 Seahorse XF RPMI Medium, pH 7.4 在开封后一个月内需用完(储藏条 件参看包装标识)
- d) 建议 103579-100 Seahorse XF 200 mM Glutamine Solution 在使用前 待充分溶化后按照每 1 mL 分装冻存
- e) 该方法使用的试剂配制好的检测液适用于 Seahorse 所有试剂盒实验

● 需要调 pH 的检测液配制方法

请准备以下物品:

- 103335-100 Seahorse XF Base Medium
- 103577-100 Seahorse XF 1.0 M Glucose Solution
- 103578-100 Seahorse XF 100 mM Pyruvate Solution
- 103579-100 Seahorse XF 200 mM Glutamine Solution
 (注: -20 °C 保存)

配制方法:

- 从 103335-100 XF Base Medium 中分装出 97 mL(超 净台中进行),向其中分别加入 1 mL glucose、1 mL pyruvate、1 mL glutamine 混匀
- 将 100 mL 混匀的培养基置于 37 ℃ 水浴锅内温育(或 37 ℃ 其他装置,保证培养基温度为 37 ℃)
- 3. 使用 1N NaOH 将 37 °C 培养基调至 pH = 7.4 ± 0.1
- 注:
- a) 调 pH 时,培养基应一直保持 37 °C
- b) 加入 NaOH 时,培养基 pH 变化会非常快,为避免 pH 调过,可缓慢且 少量加入,或换用浓度更低的 NaOH)
- 4. 使用 0.22 µm 的滤器过滤培养基
- 5. 将配好的检测液放入 37 °C 无 CO₂ 细胞培养箱中温育备用(或 37 °C 水浴后直接使用)
- 注:
- a) 检测液需现用现配,勿一次性配太多(Glutamine 需新鲜)
- b) 对于一块细胞培养板的检测,100 mL 检测液是足够的
- c) 建议 103579-100 Seahorse XF 200 mM Glutamine Solution 在使用前 待充分溶化后按照每 1 mL 分装冻存

 三.清洗细胞(本部分内容贴壁细胞选择 ★,悬浮细 胞选择 ⊙)

★ 若接种了贴壁细胞,则参照下列流程为贴壁细胞换液



B-Figure 3.1. 清洗细胞基本流程

- 1. 取出温育的检测液,准备为细胞换液
- 从 CO₂ 细胞培养箱中取出培养好的贴壁细胞,并在显微 镜下观察细胞状态
- 注:
- a) 检查细胞形态、均匀度并保证无污染情况
- b) 保证细胞贴壁良好, 汇合度达到基本标准, 无细胞堆积
- c) 细胞汇合度无需 100%,在保证基本的细胞汇合度前提下(汇合度 80%-90% 左右为最佳),更重要的是孔中细胞分布要均匀,若实验过 程中细胞被损伤或被刮擦也会影响实验质量
- d) 保证背景校正孔中无细胞
- 将细胞培养板所有孔中的生长培养基吸弃 60 µL 但需剩 余 20 µL
- 注:
- a) 建议勿使用真空吸液装置,因为较难控制吸液体积并容易损伤细胞
- b) 注意蒸发问题,通常换液前可先测量 A1 孔(或其他背景校正孔)中培养 基体积,例如孔中还剩70 μL,则需从每个孔中吸弃 50 μL,剩余 20 μL
- c) 吸液时勿损伤细胞,并保证足够的剩余培养基覆盖细胞 (如图 B-Figure 3.2)



B-Figure 3.2. 弃液后最少体积是 20 μL

4. 清洗细胞: 向所有孔中加入 200 μL 检测液, 然后再吸 弃 200 μL (如图 B-Figure 3.3)



B-Figure 3.3. 细胞换液时注意枪头位置

- 5. 重复上一步操作,孔中剩余 20 µL 检测液
- 6. 向所有孔中加入 160 μL 检测液,使终体积为 180 μL
- 7. 在显微镜下观察,以确保换液过程中没有洗掉或划掉细 胞造成分布不匀
- 8. 将细胞培养板放入 37 ℃ 无 CO₂ 细胞培养箱中 60 min 等待上机检测
- 注:
- a) 通常细胞在 37 ℃ 无 CO₂ 细胞培养箱中培养 45 60 min 即可,时间勿 过长
- b) 换液过程尽量不要产生气泡,如有气泡可用适当方法排掉汽泡
- c) 换液时,注意勿将细胞污染入背景校正孔
- d) 换液时可一手固定细胞板,另一手进行加液或弃液操作
- e) 清洗细胞时,部分情况较难准确剩余 20 μL 培养基覆盖细胞,故也可 参考图 B-Figure 3.4 进行细胞换液,此方法也适用于黏附能力较差的贴 壁细胞



B-Figure 3.4. 该细胞换液流程适用于黏附力较差贴壁细胞

f) 以上所述换液流程不适用于 103592-100 Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay Kit 和 103344-100 Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Kit 两个实验,这两个实验请按图 B-Figure 3.5 或参考图 B-Figure 3.6 进行 换液,换液完毕终体积定位 180 μL 即可上机



B-Figure 3.5. 103592-100 和 103344-100 细胞换液流程





⊙ 若使用悬浮细胞,则按照下列流程接种细胞:

参照下述方法,使用 Cell-Tak[™] 包被细胞培养板(注:通 常细胞黏附剂除 Cell-Tak[™] 外,还可根据需要选择 poly-D-Lysine, collagen 等)

- 1. 用于 Seahorse XFe96 细胞培养板的最佳 Cell-Tak 溶液 浓度为 22.4 μg/mL
- 2. 一块细胞培养板需要 2.5 mL Cell-Tak 溶液(请参考 Cell-Tak 制造商的方案制备该溶液)
- 3. 室温下向每个孔加入 25 µL 该溶液并培养 20 分钟
- 4. 使用 200 µL 无菌水清洗每个孔两次
- 5. Cell-Tak 包被的 Seahorse 细胞培养板在 4 °C 下可以保 存一周时间
- 6. 细胞接种前, Cell-Tak 包被的细胞培养板必须放至室温

注:根据 Cell-Tak[™] 制造商的使用说明,细胞接种前请勿在 Cell-Tak 包被的 细胞孔中预孵育含血清的培养基,因为这可能导致粘附力丧失

参照下述方法,在一块 Cell-Tak[™] 包被的细胞培养板中接 种悬浮细胞

- 注: 接种细胞之前, 应先确定最佳的细胞接种密度
- 1. 准备好 37°C 温育好的检测液
- 取 50 mL 离心管,加入合适体积的细胞悬液。计算接种细胞总数时,按 100 孔的细胞量计算(如每孔接种100K 细胞,则 50 mL 离心管中细胞总数为 100K cells/ well × 100 wells = 10000K cells)
- 3. 在室温下以 200 × g 离心细胞 5 min
- 4. 离心细胞时,向已放至室温条件,包被 Cell-Tak 的细胞 培养板的背景校正孔中加入 50 μL 检测液
- 5. 将离心后的细胞上清液弃去
- 6. 向离心管中加入合适体积的温育检测液重悬细胞,以得 到所需的每孔中 50 μL 的细胞密度(如每孔接种 100 K cells/50 μL,则离心管中 100 孔接种量应为 10000 K cells/5 mL)

- 7. 将离心机设置更改为零制动
- 将细胞悬液转移至无菌加液槽中使用多道移液枪吸 取,或直接从离心管中吸取
- 向细胞培养板中沿每孔侧壁加入 50 µL 细胞悬液,背景 校正孔请勿接种细胞
- 10. 以 200 × g (零制动) 离心细胞板 1 min。确保离心机 经适当平衡
- 11. 将细胞培养板放入未补充 CO₂ 的细胞培养箱,37 °C 培养 25-30 min 确保细胞完全贴壁,目测确认大多数细胞已稳定地附着在培养基表面
- 12. 将 130 µL 预热的检测液沿每孔侧壁缓慢补加入细胞 孔,注意不要扰乱细胞
- 13. 显微镜下观察细胞,确保细胞贴壁
- 14. 将细胞板放回培养箱中培养 15-25 min
- 15. 15-25 min 后,细胞板即可用于分析。为获得最佳结果,离心后的总时间不超过 60 min

四. 配药并将药物加入探针板加药孔 (port) 中

- 配药 重悬药物并稀释为工作液(本部分内容以 103015-100 Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit 为 例,其他 kit 请参考试剂盒的 User guide)
- 注: 配药前请先阅读该注意事项
- a) 药物重悬后在当天使用,并丢弃剩余药物,请勿冻存药物,每一包药 物足够一块 XF Pro 细胞板的检测
- b) 使用检测液重悬和稀释药物,请勿使用 DMSO 配药,请勿向药物中加入 BSA 或血清(药物含有血清或 BSA 可能导致药物注射失败)

配药过程如下:

- 1) 从试剂盒中取出一包铝箔袋装药物和开盖器
- 2) 打开铝箔袋,取出含有 oligomycin(蓝色盖)、FCCP (黄色盖)和 Rot/AA(红色盖)的三个药管,将三个药 管置于适配的管架上

3) 使用开盖器将药管打开,如图 B-Figure 4.1



B-Figure 4.1. 开盖器的使用方法

4) 取出准备好的 37 ℃ 检测液,按照下表所示体积分别加入对应药管中,并使用移液枪温和地吹打混匀(吹打约10次或涡旋混匀),使药物充分溶解。

Compound	Volume of assay medium	Stock concentration	Cap color
Oligomycin	630 µL	100 µM	Blue
FCCP	720 µL	100 µM	Yellow
Rot/AA	540 µL	50 µM	Red

5)使用检测液将重悬后的药物稀释为所需浓度的药物工作液,每种药物工作液大约准备 2-3 mL(药物工作液均为 10×浓度并将被加载入探针板,请保证药物工作液 pH = 7.4 ± 0.1,37 ℃),可参照按照下表稀释,药物工作液准备好后等待加药

	Final well (µM)	Stock solution volume (µL)	Media volume (µL)	10X (Port) (µM)	Volume added to port (µL)
	0.5	150	2850	5	20
Port A Oligomycin	1.5	450	2550	15	20
engenijem	2.5	630	1890	25	20
	0.125	37.5	2962.5	1.25	22
	0.25	75	2925	2.5	22
Port B FCCP	0.5	150	2850	5	22
	1.0	300	2700	10	22
	2.0	600	2400	20	22
Port C Rot/AA	0.5	300	2700	5	25

注:

- a) 对于大部分细胞系而言,oligomycin 浓度建议 1.5 µM, Rot/AA 浓度建 议 0.5 µM, 对于所有细胞系的 FCCP 浓度均没有推荐
- b) 值得注意的是,为了得到最大药物效应,所有药物的最佳终浓度都是 细胞系相关的,并且可能受检测液种类影响。因此强烈建议,对于 每种新细胞系或检测液,进行药物浓度优化实验以确定最佳浓度。对 FCCP 尤其重要,FCCP 浓度偏低造成 OCR 无法达到最大响应值,而 超过最适浓度会引起 OCR 响应值低于最大值,只有最适 FCCP 浓度可 以得到 OCR 的最大响应值
- c) FCCP 浓度优化范围需根据实际需要设置,通常为 0-2 μM(部分细胞 最适 FCCP 浓度可能超过 2 μM),可如图 B-Figure 4.2 方法配置浓度 梯度溶液



B-Figure 4.2. FCCP 浓度梯度溶液倍比稀释方法

d) XF Pro 可同时优化细胞密度和 FCCP 浓度,若进行这两个条件的摸索 实验,实验设置可参考如图 B-Figure 4.3



B-Figure 4.3. XF Pro 细胞密度及 FCCP 浓度优化实验设置

2. 将药物加载入探针板加药孔 (port) 中

XF Pro 探针板俯视如图 B-Figure 4.4,每个细胞孔均对应 4 个加药孔,整板加药孔包含 4 个系列: A-加药孔、B-加药 孔、C-加药孔、D-加药孔。



B-Figure 4.4. XF Pro 探针板俯视模拟图

在 XF Pro Flux Assay Kit 中除探针板装置外,另有两块加 药辅助板 (建议加药时使用),分别是 A/D 加药辅助板 (如图 B-Figure 4.5)和 B/C 加药辅助板 (如图 B-Figure 4.6),用法如下:

- 当把 A/D 板的 A 标识对准探针板的 A1 孔,则 A/D 板上
 96 孔均对应探针板的 A-加药孔
- 当把 A/D 板的 D 标识对准探针板的 A1 孔,则 A/D 板上
 96 孔均对应探针板的 D-加药孔
- 当把 B/C 板的 B 标识对准探针板的 A1 孔,则 A/D 板上
 96 孔均对应探针板的 B-加药孔
- 当把 B/C 板的 C 标识对准探针板的 A1 孔,则 A/D 板上
 96 孔均对应探针板的 C-加药孔



B-Figure 4.5. A/D 加药辅助板



B-Figure 4.6. B/C 加药辅助板

注:加药前请先阅读该注意事项

- a)每个系列的加药孔必须加入相同体积的药物(例如,所有 A-加药孔加入药物的体积必须相同,所有 B-加药孔加入药物的体积必须相同,……)
- b) 整板所有细胞孔(包含背景校正孔),参与药物注射的同系列加药孔都 必须加入药物,否则会影响药物注射过程(例如,只要有一个细胞孔 的 A-加药孔加入了药物,那么所有细胞孔的 A-加药孔必须加入相同体 积的药物,如果 D-加药孔不参与药物注射,那么所有细胞孔的 D-加药 孔都无需加入药物或液体)
- c) 加药时,探针板必须保留在工具板上,并且在整个加药过程中探针板 必须平放于台面,不能拿起或倾斜
- d) 加药时请在 XF Pro 仪器旁进行,加完药后移动探针板时请小心,以防 药物泄漏
- e) 包含血清或 BSA 的溶液不建议加入加药孔(含有血清或 BSA 可能导致 药物注射失败)
- f) 若实验存在用户待测药物需上机检测时注射入细胞孔,则将待测药物加入 A-加药孔(该过程被称为 Acute injection,对应软件中 Acute injection 模板),试剂盒内药物按 B-C-D 顺序依次加入对应加药孔;若无待测药物或使用待测药物预处理细胞,则将试剂盒内药物按 A-B-C-D 顺序依次加入对应加药孔

加药过程如下(本部分内容后附有图 B-Figure 4.9,请参考):

- 从 37 ℃ 无 CO₂ 细胞培养箱中取出水化好的探针板, 去除水化辅助板及探针板板盖,保证探针板放置在工 具板上
- 2) 取对应的加药辅助板,放置于绿色探针板上
- 注: 若不使用加药辅助板,则直接将药物注入加药孔中

- 3) 取出准备好的药物工作液 (37°C),将相应药物以相应的体积依次加入探针板的对应加药孔中(各系列加药孔加入体积为: A-加药孔加入 20 μL,B-加药孔加入 22 μL,C-加药孔加入 25 μL,D-加药孔加入 27 μL)
- 注:
- a) 加药体积取决于加药孔而与药物无关,待加入的药物溶液均为 10× 浓度
- b) 移液枪吸取药物工作液或加入药物时请勿产生气泡
- c) 向加药孔中加入药物,保持移液枪头竖直探入加药辅助板的孔中注入 药物(如图 B-Figure 4.7),若枪头没有探入加药辅助板的孔中,则可 能导致药物无法成功注入加药孔中



B-Figure 4.7. 加载药物时移液枪头竖直探入辅助板孔中

- d)请一次性缓慢地将药物完全注入加药孔中,中途请勿停留以避免气泡 产生
- e) 注入药物时避免产生气泡非常重要,如果产生气泡请勿尝试通过轻弹 探针板来清除气泡,否则将导致药物从加药孔内泄漏
- f) 如有需要,探针板或加药辅助板的表面可使用记号笔标记
- 4) 药物加载完毕去除加药辅助板
- 5) 检查各加药孔中药物注入情况

注:

- a) 观察时将探针板移至视线水平位置并保持探针板水平(如图 B-Figure 4.8),若探针板倾斜可能会导致药物泄漏
- b)所有加药孔中药物工作液应位于加药孔底部并覆盖加药孔底部出口, 检查是否存在药液挂壁情况
- c) 检查各系列加药孔(如所有的 A-加药孔)中药物液面的一致情况,记 录液面异常的加药孔以供后续数据分析



B-Figure 4.8. 检查加药仓中药物注入情况的方式

- b)所有加药孔中药物工作液应位于加药孔底部并覆盖加药孔底部出口, 检查是否存在药液挂壁情况
- c) 检查各系列加药孔(如所有的 A-加药孔)中药物液面的一致情况,记 录液面异常的加药孔以供后续数据分析



B-Figure 4.9. 加药仓结构及药物加载示范

图 B-Figure 4.9 说明:

图 a 为加药孔结构模拟图;图 b 为实验中药物注射模拟 图;图 c 为错误示范,请勿将枪头完全插入加药孔底部, 否则会导致药物泄漏;图 d 为使用加药辅助板加药时的标 准示范,图 e 为不使用加药辅助板加药时的示范,加载药 物请参看图 d 或图 e 操作;图 f、g 为药物注入正常;如出 现图 h 中情况,会导致药物注射失败。

五.上机运行 XF 实验(软件设置以 XF Cell Mito Stress Test Kit 为例)

1. 如图 B-Figure5.1,在 wave 软件模板界面选择对应试剂 盒的模板打开(双击模板或点击 OpenFile)

注: 部分试剂盒有两个模板。如图 B-Figure5.2 模板后标注(Acute Injection,红色圈出),若选择该模板,即表明研究的药物将通过 A 加药 孔注射入细胞孔检测其对细胞代谢的影响。若无药物处理或细胞培养时加 入药物预处理则选择无该标注模板



B-Figure 5.1. 选择对应试剂盒的模板



B-Figure 5.2. 部分试剂盒模板后标注 (Acute injection)

- 2. 打开模板后(如图 B-Figure 5.3),根据实验设计完成组 定义设置,将生成符合设计的分组,然后在板布局界面 完成分组布板,进入程序设置界面检查程序,进入运行 实验界面点击 Start Run,则弹出对话框选择实验数据的 保存位置,然后仪器弹出载板托盘。
- 注:请注意仪器的载板托盘出口无杂物阻挡



 载板托盘弹出后,按软件提示(如图 B-Figure 5.4)将 探针板和水化板组合(必须去掉探针板的盖子和粉红 色的水化辅助板)放置于托盘上,注意探针板放置方向 (探针板 A-D 行标识在左侧或探针板三角缺口位于左下 角),然后点击 Load Cartridge,托盘进入仪器,开始 校准(约 20 min)

Load Cartridge

1. Make sure the lid and hydrobooster have been removed from the **Sensor Cartridge**.



- Place the Sensor Cartridge and Utility Plate on the thermal tray.
- Ensure that the S/N label and corner marker are oriented as shown below.



B-Figure 5.4. 放置探针板和水化板进行校准

- 4. 校准完成后,软件弹出图 B-Figure5.5,此时从 37°C 无 CO₂细胞培养箱中取出细胞培养板(显微镜下观察细 胞状态),点击 Open Tray,托盘弹出并出现图 B-Figure 5.6,将水化板取下并将细胞培养板去除板盖后放至托 盘上,并点击 Load Cell Plate
- 注:细胞培养板缺口位于左下角,放置方向同探针板

B-Figure 5.3. Wave Pro 软件设置



B-Figure 5.5. 校准完成提示



B-Figure 5.6. 加载细胞板提示

 细胞板进入仪器后,仪器开始细胞能量代谢测量阶段, 测量结束后,软件弹出图 B-Figure 5.7,点击 Eject,托 盘弹出取下探针板和细胞培养板,点击 OK,托盘进入 仪器



B-Figure 5.7 测量结束弹出探针板和细胞培养板

6. 整个能量代谢测量过程结束,弹出图 B-Figure 5.8,点击 View Results 查看结果或点击 Wave home 返回主界面



B-Figure 5.8 检测结束选择

- 实验结束,取出细胞培养板和探针板后,检测探针板加 药孔中的药物是否全部注射入细胞孔,有无注射失败情 况,并记录以备后续数据分析
- 8. 选择合适的方法对细胞培养板每孔样本进行定量,然后 对数据进行归一化处理

Seahorse XF 实验常见问题及解答(附 1)

1. 可以使用失效(超出保质期)的探针板或重复使用吗?

安捷伦无法保证因使用超出保质期的探针板或重复使用探 针板而得到的实验数据质量(有效性),为得到最佳最真 实的数据,请使用有效期内的探针板及其他消耗品。

2. 探针板水化超出水化时间怎么办?

安捷伦建议将探针板放入 37 ℃ 无 CO₂ 培养箱中水化过夜 以得到最优结果。最短水化时间是 37 ℃ 水化 4 小时,但 是为得到最佳数据不建议采用这么短的时间。探针板最长 水化时间是 37 ℃ 水化 72 小时,但由于液体蒸发需要补充 (或更换) 水化液,因此 37 ℃ 无 CO₂ 培养箱务必放置水盘 保证湿度。

3. Fluxpak 和探针板有什么区别?

探针板是 Fluxpak 的组成部分,一个 Fluxpak 包含探针板、水化板、校准液和细胞培养微孔板。以上各消耗品数量因所购 Fluxpak 类型而不同。探针板不能单独订购,必须定购 Fluxpak 来购买。但细胞培养板可单独购买。

4. 一次实验可以只使用探针板的其中一部分吗?

为了将所有药物或化合物成功地注入细胞培养孔中,安捷 伦建议水化整个探针板并因需要将相同字母标注的全部加 药孔注入药物(请参考实验流程中关于加载药物的注意 事项)。

5. 实验中为何必须设置空白/背景校正孔?

空白孔/背景校正孔被用来过滤掉实验的干扰因素,比如温 度和 buffering capacity,这些干扰因素会影响氧含量和 pH 变化(非来源于代谢变化的影响)。背景校正孔还能被用 来修正整板间温度波动,来诊断潜在温度问题,作为实验 获得非期望数据时的原因筛查的切入点。

6. 为何细胞培养板需要在 37 °C 无 CO₂ 培养箱中放置 45-60 min?

细胞培养板在 37 °C 无 CO_2 培养箱中孵育 45–60 min 的目 的是为了脱气,释放 CO_2 。

7. Seahorse XF 报告生成器中的代谢数据是如何计算的?

在每个试剂盒的 Seahorse XF 报告生成器的用户指南中详 细列出了数据的计算公式,请参阅。

8. 请问进行 FAO 实验时,能够在探针板上加载 BSApalmitate 使其在上机测量时自动注射入细胞孔吗?

安捷伦建议将 BSA-palmitate 或相似底物在培养细胞时做 预处理。如果实验存在合理依据需在上机测量时通过注射 加入 BSA-palmitate、血清或其他类似底物,请联系相关技 术支持。

9. 使用组织黏附剂处理细胞培养板会影响 XF 实验测量吗?

不会。使用诸如 poly-L-Lysine、fibronectin、Gelatin、 poly-D-lysine 和 Cell TakTM 等组织黏附剂处理细胞培养板 时,不会影响 XF 仪器测量的效果及实验参数分析。

10. Seahorse XFe 96/XF Pro 细胞培养微孔板的每个细胞 孔的最大体积是多少?

 $300 \ \mu L_{\circ}$

11. Seahorse XF 检测液中需要加入抗生素吗?

无需加入抗生素,因为大部分 XF 实验在几小时内就结束 了。

12. 可以在 Seahorse 检测液中加入血清吗?

不建议加入血清(如:FBS),因为其会影响检测液的缓冲 能力,并可能与进行检测的药物/化合物发生非特异性结 合而影响检测效果。另外,使用加入血清的检测液溶解药 物加载至探针板加药孔中进行注射时,会出现注射失败的 情况。

如必须加入血清,则加入较低浓度,或进行血清滴定实验 来确定浓度。

13. 加入底物的检测液在多长时间内可保持稳定? 或可以 提前配好检测液吗?

安捷伦建议 Seahorse 检测液在实验当天现用现配。

14. 可以购买试剂盒中同名称的其他厂家的药物自配进行 代谢检测吗?

建议使用 Seahorse 配套试剂盒进行检测,所有试剂盒均经 过质量校验及验证,可保证实验数据的质量,且分析非期 望数据时更容易便捷,节省时间。

15. Seahorse XF 糖酵解压力试剂盒的药物状态看上去很奇 怪,是否有质量问题(或其他试剂盒中部分药物)?

如 Glycolysis stress test kit 中的 2-DG,该药可能是透明的 液体、不透明的(白色的)固体,也可能是白色固体与透 明液体的混合物,以上药物状态均不影响其性能,可按照 说明书正常溶解使用。

Seahorse XF Pro M 细胞培养微孔板和 Seahorse XFe96/XF Pro 细胞培养微孔板的区别?

Seahorse XF Pro M 细胞培养微孔板周围带有一圈水槽,可以更好地减小边缘效应,提高数据质量。且此板只适用于 Seahorse XF Pro 的仪器。

17. 为何不能使用 GlutaMAX 来代替 Glutamine 呢?

不建议使用 GlutaMAX 来配制检测液。因加入 GlutaMAX 后,还需细胞进一步将其转化为 Glutamine,这可能会影 响线粒体对 Glutamine 氧化的动力学过程。

18. 检测液的 pH 对 XF 实验非常重要吗?

是的! Seahorse XF 实验通过测定细胞代谢物(如氧和 质子)的变化来确定 OCR 和 ECAR,而检测液 pH 会影 响这些代谢的产生或消耗,因此保持检测液一致的 pH (37 ℃, pH = 7.4)非常重要。

19. FluxPak 中的水化板可以替代细胞培养板吗?

不可以,虽然水化板与细胞培养板结构相同,但不能用来 培养细胞。

20. Seahorse 数据分析软件 Wave Pro 可以免费下载安装吗?

是的,可在安捷伦官网找 Wave Pro 下载网址(下一部分 内容已列出),并且免费下载安装。

21. 使用的是安捷伦 Seahorse XF DMEM(或 RPMI)培养 基,pH 7.4 为什么糖酵解速率测定/ATP 速率测定的结 果分析中不显示 PER 的数据?

实验的缓冲系数 Buffer Factor (BF) 需要进行设置,具体操 作如下:

 在 Wave Pro 软件中打开检测结果文件,点击 "Modify"(如 Figure S1 所示):



Figure S1. Modify 选项

2. 点击 Assay Media 后的"Add" (如 Figure S2 所示):



Add

Figure S2. Assay Media 选项

3. 请使用 Media catalog 下拉菜单, 选择实验所用的 Assay Medium (如 Figure S3 所示):

	Edit Assay	/ Medium
	Name	
	Assay Media	1
	h	
	Media	• •
Glycolytic Rate Assay Medium	(DMEM-based)	
		ssay Medium (DMEM-based)
Glycolytic Rate Assay Medium	(RPMI-based)	
Carlana VI Assas Madium		<u> </u>
Seanorse XF Assay Medium		
Seahorse XF Base Medium wit	thout Phenol Red	without Phenol Red w/ 5 mM HEPES, 10
Agilent Technologies		vol/L/pH)
Seahorse XF Base Medium		
Seanorse XF KPMI Medium wi	thout Phenol Red	
Agilent Technologies		
	۷	>

Figure S3. Assay medium 媒体菜单

 点击 Assay Media,设置背景孔 Buffer Factor——点击 Configure,在列标题 Default Buffer Factor 下,选中每 个背景框旁边的复选框,然后单击 Save(如 Figure S4 所示):

Row	Column	Buffer Factor (mmol/L/pH)	Default Buffer Factor
A	1	2.80	\checkmark
А	12	2.80	\checkmark
н	1	2.80	\checkmark
н	12	2.80	\checkmark
efault Bu	uffer Factor	= 0.00(mmol/L/pH) is displ	ayed until the assay is rur ve Cancel

Figure S4. 设置背景孔 Buffer Factor

5. 将 Assay Medium 分配到组列表中的每个组。首先单击 Collapse/Expand 以显示每个组的 Group Definitions(如 Figure S5 所示):

Groups

	Add Group Collapse/Expand Down Up	
	Background	
4	Control	•
	Mito Stress Test	•
	Mito Stress Test Assay 🔻 🞯 Cells	•
4	Experimental	0 0 0
	Mito Stress Test	•
	Mito Stress Test Assay 🔻 😻 Cells	•

Figure S5. Collapse/Expand 选项

6. 使用"Medium"下拉菜单,将已设定好的 Assay Medium 添加到每组(如 Figure S6 所示):

4	HepG2 control			0 0
	XF Glycolytic Rate Assay	•	Control	•
	Media Undefined	•	W C2C12	•
	Media Undefined			
	XF Glycolytic Rate Assay Media			

Figure S6. Media 下拉菜单

- 完成后,单击 Apply。当使用 Rate 下拉菜单选择时,动 力学图将显示 PER 数据。完成分析后,保存对结果文 件所做的更改
- 注: 详情可参考

https://www.agilent.com.cn/cs/library/quickreference/ public/Proton_Efflux_Rate_Quick_Reference_Guide_Final. pdf

以上为 Seahorse XF 实验常见问题,若您想了解安捷伦 Seahorse 其它试剂盒实验遇到的问题,可以阅读相对应的 试剂盒说明书内容最后的常见问题解答。

Seahorse XF 技术常用资源网址(附 2)

1. 安捷伦 Seahorse XF 产品网址:

https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis

2. 安捷伦 Seahorse Wave Pro 下载地址:

https://www.agilent.com.cn/zh-cn/product/cell-analysis/ real-time-cell-metabolic-analysis/xf-software/seahorsewave-pro-software-2007523

3. 安捷伦 Seahorse XF 技术学习中心网址:

<u>https://www.agilent.com/zh-cn/products/cell-analysis/</u> how-to-run-an-assay (中文)

<u>https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-</u> to-run-an-assay (英文)

4. 安捷伦 Seahorse 细胞参考文献数据库网址(内容可定 向可搜索):

https://www.agilent.com/search/?N=4294836537

5. 安捷伦 Seahorse analytics 登录注册地址(导航栏界面 - 工具):

https://www.agilent.com.cn/zh-cn/product/cell-analysis/ real-time-cell-metabolic-analysis/xf-software/agilentseahorse-analytics-787485

6. 安捷伦 Seahorse XF 技术官网介绍(可链接不同领域):

<u>https://www.agilent.com.cn/zh-cn/solutions/cell-analysis/</u> <u>cell-metabolism</u>(中文)

<u>https://www.agilent.com.cn/en/solutions/cell-analysis/</u> <u>cell-metabolism</u>(英文) 查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278,400-820-3278(手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料 所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司,2024 2024 年 5 月 13 日,中国出版 5994-××××ZHCN

