

Agilent Seahorse XFp 实验操作手册



Seahorse XFp 实验用试剂盒和培养基

订购货号	产品说明	产品内容
103591-100	Seahorse XFp 实时 ATP 速率测定试剂盒	6 包
103676-100	Seahorse XFp 实时 ATP 速率测定试剂盒起始工具包	包含 103591-100、103575-100、103577-100、103578-100、103579-100 各一个
103275-100	Seahorse XFp 细胞能量代谢表型测定试剂盒	12 包
103010-100	Seahorse XFp 细胞线粒体压力测定试剂盒	6 包
103707-100	Seahorse XFp 细胞线粒体压力测定试剂盒起始工具包	包含 103010-100、103575-100、103577-100、103578-100、103579-100 各一个
103017-100	Seahorse XFp 糖酵解压力测定试剂盒	6 包
103270-100	Seahorse XFp 线粒体底物分析试剂盒	6 包
103346-100	Seahorse XFp 糖酵解速率测定试剂盒	6 包
103709-100	Seahorse XFp 糖酵解速率测定试剂盒起始工具包	包含 103346-100、103575-100、103577-100、103578-100、103579-100 各一个
102720-100	Seahorse XF 棕榈酸盐-BSA FAO 底物	3 × 3 mL 棕榈酸盐-BSA 3 × 3 mL BSA 对照
102504-100	Seahorse XF 细胞膜通透剂	
102353-100	Seahorse XF 基础培养基 (2 × 1 L)	
103334-100	Seahorse XF 基础培养基, 500 mL	
103193-100	Seahorse XF 基础培养基, 100 mL	
103335-100	Seahorse XF 基础培养基, 不含酚红, 500 mL	
103337-100	Seahorse 1 mol/L HEPES, 30 mL	
103575-100	Seahorse XF DMEM 培养基, pH 7.4, 500 mL	
103576-100	Seahorse XF RPMI 培养基, pH 7.4, 500 mL	
103577-100	Seahorse XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液, 50 mL	
103578-100	Seahorse XF 100 mmol/L 丙酮酸溶液, 50 mL	
103579-100	Seahorse XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液, 50 mL	
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

Seahorse XFp 实验用塑料耗材

订购货号	产品说明	产品内容
103022-100	Seahorse XFp FluxPak	12 块 XFp 探针板, 12 块 XFp 细胞培养微孔板
103025-100	Seahorse XFp 细胞培养板	12 块细胞培养微孔板
103057-100	Seahorse XFp Carrier Tray (XFp 适配托盘)	包含 4 个托盘

Agilent 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”。糖酵解发生在细胞胞浆中，是一种无氧分解过程，主要将葡萄糖分解成乳酸并产生少量 ATP。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；神经生物学家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. Agilent Seahorse XF 能量代谢检测技术简介

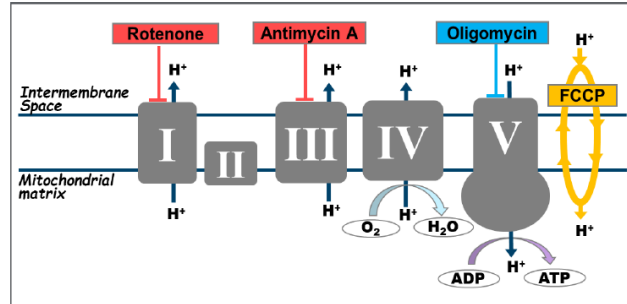
XF 技术是依托 Seahorse XF 能量代谢检测系统，利用专利设计的非侵入、无标记式传感器，同时、实时测量活细胞的两条能量代谢通路，量化细胞代谢表型，从而分析细胞功能的变化。XF 技术通过测定氧气消耗速率（Oxygen Consumption Rate, **OCR**）来反映细胞线粒体的功能，通过测定细胞外酸化速率（Extra Cellular Acidification Rate, **ECAR**）来反映糖酵解功能。

目前，安捷伦提供 3 种 XF 分析系统，分别是 XFe96 分析仪（96 孔形式）、XFe24 分析仪（24 孔形式）、XFp 分析仪（8 孔形式），三款仪器均可检测贴壁细胞、悬浮细胞和分离线粒体的能量代谢。其中，XFe96 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 胰岛捕获微孔板检测组织类样本（如胰岛、脑组织、骨骼肌、脂肪组织、斑马鱼胚胎、线虫、果蝇等等）的能量代谢；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，满足细胞代谢的测量，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**。

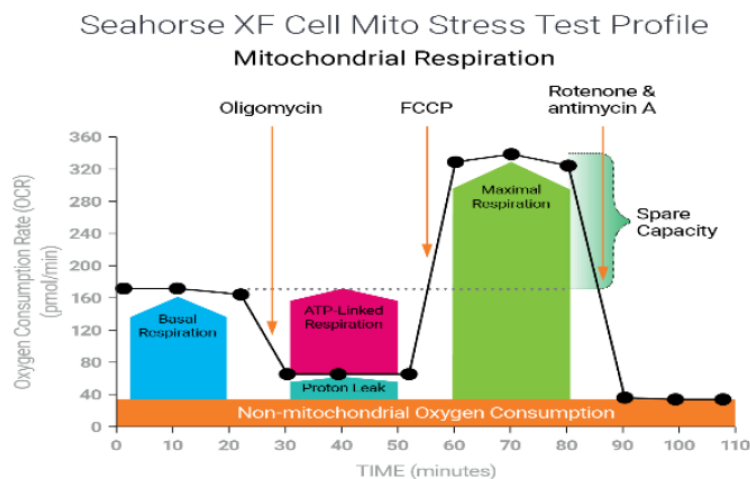


该实验使用的药物为 oligomycin、FCCP、rotenone/antimycin A, 加入顺序及 ETC 靶点如附图, 以下为药物的原理解释:

Oligomycin: 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: 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值), 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: 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之外活动所驱动的非线粒体呼吸耗氧。



basal respiration: 用于满足细胞的 ATP 需求和质子漏的耗氧。代表细胞在基础状态下的能量需求。

ATP-linked respiration: 加入 oligomycin 后产生的耗氧下降部分, 占基础呼吸耗氧的一部分, 用于驱动 ATP 合成。代表线粒体满足细胞能量需求的 ATP 合成能力。

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。质子漏可作为线粒体损伤的标志, 也可被认为是调节线粒体 ATP 合成的一种机制。

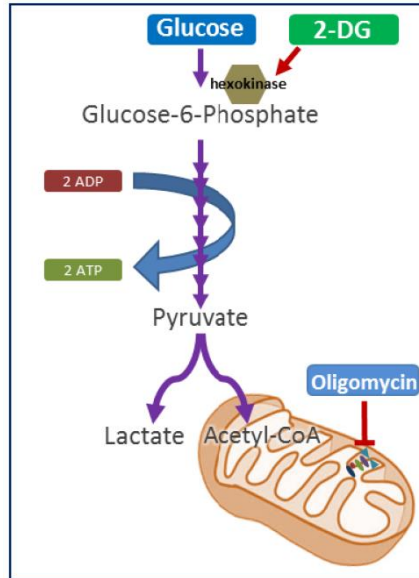
maximal respiration: 加入 FCCP 后获得的细胞最大耗氧。FCCP 通过刺激细胞呼吸链以最大能力工作，来模拟一种生理上的“能量需求”，这引起了底物（糖、脂肪、氨基酸）的快速氧化以应对这种代谢挑战。代表了细胞能够实现的最高呼吸速率。

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。

non-mitochondrial oxygen consumption: 加入 rotenone 和 antimycin A 后仍持续的耗氧，这是由一部分细胞酶继续耗氧产生的。该参数对于精确测量线粒体呼吸功能非常重要。

XF Glycolysis Stress Test Kit (糖酵解压力测试)

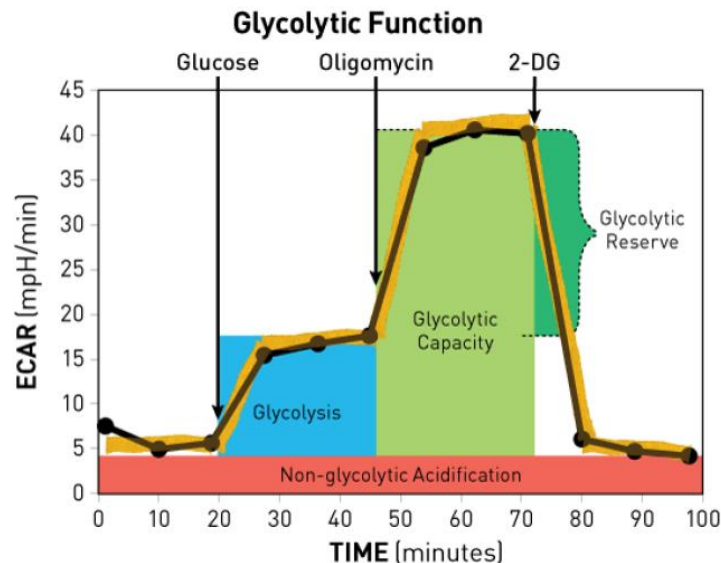
葡萄糖在胞浆中转化为丙酮酸，进一步转化为乳酸，并向细胞外环境中释放质子，引起胞外环境的酸化，本实验即测量细胞的胞外酸化率 (ECAR)。需要注意，糖酵解压力测试实验的检测液中没有 glucose 和 pyruvate，因此配制检测液时勿加入这两种底物。本实验通过依次加入 glucose、oligomycin 和 2-DG 来得到反映细胞糖酵解功能的参数，包括 **Glycolysis**、**Glycolytic capacity**、**Glycolytic reserve** 和 **Non-glycolytic acidification**。



Glucose: 实验第一次加入的药物是饱和浓度的葡萄糖，细胞通过糖酵解途径利用该葡萄糖并将其分解为 pyruvate，产生 ATP、NADH、水和质子。质子释放入胞外环境引起 ECAR 的迅速升高，这种由葡萄糖诱导的细胞应答被称为细胞在基础条件下的糖酵解能力。

Oligomycin: 实验第二次加入的药物为 oligomycin，ATP 合酶的抑制剂，可抑制线粒体 ATP 产生，从而将能量产生转移至糖酵解通路，引起 ECAR 进一步升高，反映了细胞最大的糖酵解能力。

2-DG (2-deoxy-glucose): 2-DG 是最后加入的药物，该药通过竞争性结合糖酵解途径的己糖激酶而抑制糖酵解，引起 ECAR 降低从而证实实验中 ECAR 的产生来源于糖酵解途径。



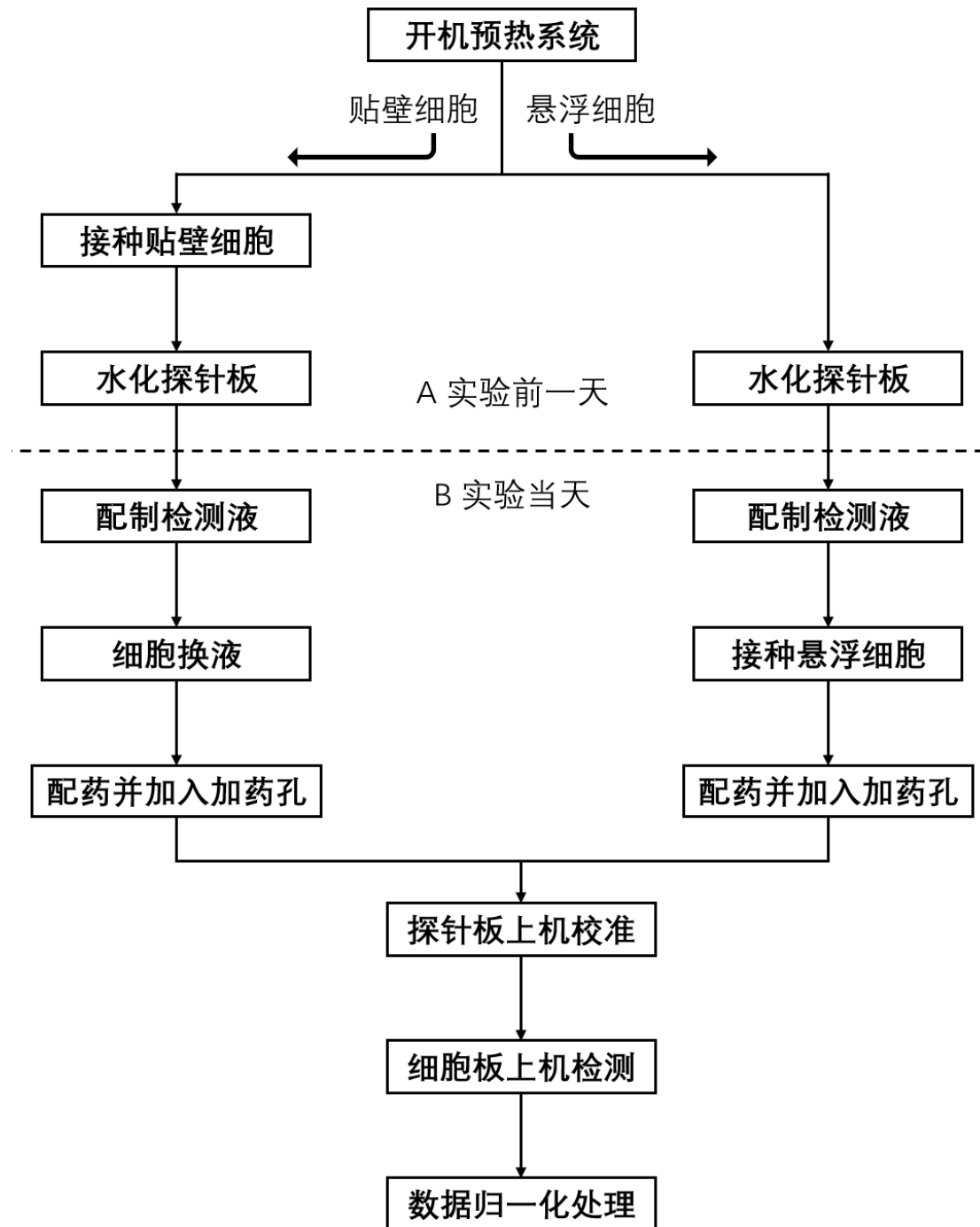
Glycolysis: 葡萄糖转化为丙酮酸的过程，本实验中加入饱和浓度葡萄糖后细胞达到的 ECAR 值，反映细胞在基础条件下的糖酵解能力。

Glycolytic capacity: 加入 oligomycin 后，细胞达到的最大 ECAR 值，指 oligomycin 有效关闭了氧化磷酸化功能后，迫使细胞利用糖酵解达到的最大产生能量的能力。

Glycolytic reserve: Glycolytic capacity 与 Glycolysis 的差值，反映了细胞满足能量需求的能力，以及糖酵解功能与细胞理论最大值之间的接近程度。

Non-glycolytic acidification: 细胞外酸化的其他来源，非来自糖酵解途径。

Seahorse XFp 实验操作流程



A. 实验前一天-准备工作

一. 开启并预热检测系统

按下 Seahorse XFp 仪器的开关开启仪器，并升温至 37°C，界面如图 A-Figure 1。

NOTE: Seahorse XFp 检测系统至少提前 5 小时开启。

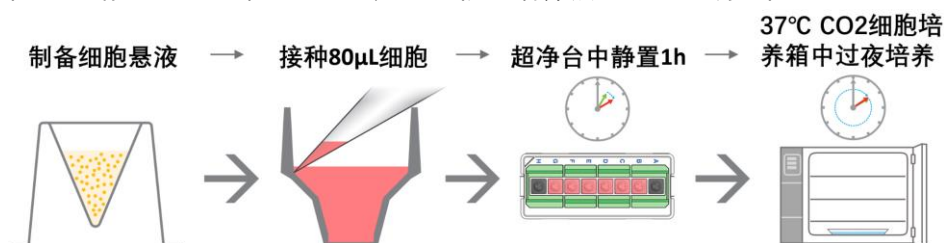


A-Figure 1 开机预热界面

A. 实验前一天-准备工作

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）

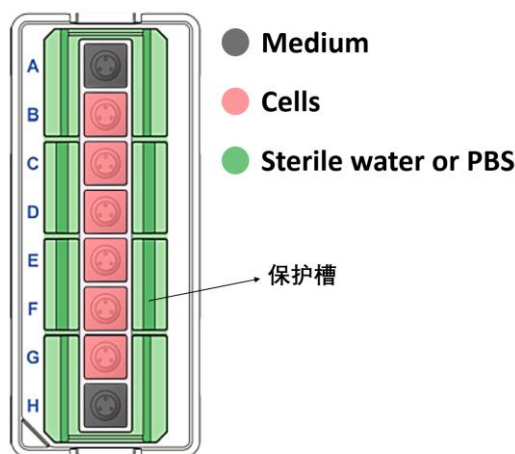
每块 XFp 细胞培养板包含 8 个细胞培养孔，培养孔两侧各有 4 个保护槽。XFp 细胞培养板每孔的接种面积为 0.106 cm^2 ，为普通 96 孔细胞培养板每孔接种面积的 40%。随仪器附有载板托盘，操作时可将细胞培养板或探针板装置放置在托盘上，增强稳定性。在接种细胞之前，应先确定细胞最佳接种密度，不同类型细胞的最佳接种密度不同，通常在 10-40K/well 范围内优化。请注意对于部分细胞系，需要根据培养该细胞经验确定优化范围。



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. 准备载板托盘（建议使用）和一块 XFp 细胞培养板（细胞板如图 A-Figure 2.2 ）。。



A-Figure 2.2 XFp Mini-细胞培养板结构及所加液体

2. 在超净工作台中打开细胞培养板，将培养板置于载板托盘上固定（如图 A-Figure 2.3）。

Note: 建议配合载板托盘操作，增强细胞板操作时稳定性，一个载板托盘可放置 3 块细胞培养板。

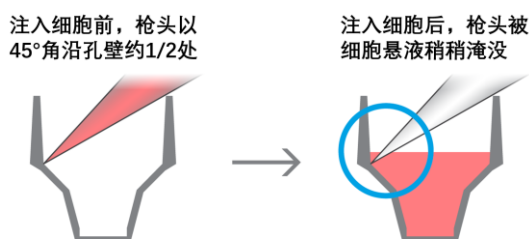


A-Figure 2.3 细胞板固定于载板托盘上

3. 在 XFp 细胞培养板 A-H 孔两侧 8 个保护槽中各加入 400μL 无菌水或 PBS，共加入 3200μL。

Note: 亦可使用 8 道移液枪吸取 200 μ L 无菌水或 PBS 分别加入两侧保护槽中, 每个保护槽中两个枪头。

4. 在细胞板 A 孔和 H 孔中各加入 80 μ L 生长培养基 (勿加入细胞)。
5. 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 μ L 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 μ L/well = 125K cells/mL)。
6. 在细胞板的 B-G 孔中各接种 80 μ L 细胞悬液 (可参考图 A-Figure 2.4 操作, 接种细胞时注意移液枪头位置)。



A-Figure 2.4 接种细胞时移液枪头位置

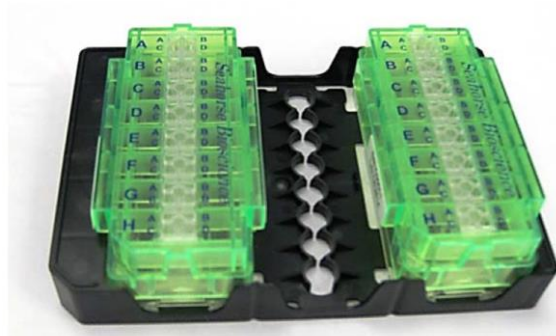
7. 将细胞培养板于超净工作台中静置 1h 使细胞自然沉降, 这有助于细胞均匀分布并降低某些细胞类型的边缘效应 (**NOTE:** 请注意这一步很重要, 细胞接种完毕勿移动细胞培养板, 盖上盖子使其直接进入静置状态, 使用载板托盘可防止迷你细胞板移动)。
8. 将载板托盘和细胞培养板一同放入 37°C CO₂ 细胞培养箱中以使细胞贴壁并过夜培养 (**Note:** 细胞培养时间根据实验需求可能有所不同), 上机前细胞汇合度需达到 50-90% (建议细胞汇合度达到 80-90%左右为最佳)。

NOTE: 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。

A. 实验前一天-准备工作

三. 水化探针板（两步法-第一步）

1. 将至少 5mL 的 XF 校准液 (XF Calibrant) 加入 15mL 离心管中，放入 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中孵育过夜（无 CO₂ 指未额外补充 CO₂）。
2. 打开 XFp Fluxpak 取出探针板装置，包含底部的水化板、绿色的探针板和盖子。



A-Figure 3.1 探针板装置固定于载板托盘上

3. 准备一个载板托盘（建议使用），将探针板装置放置于托盘上（如图 A-Figure 3.1，一个载板托盘可同时固定两个探针板装置），并从水化板上取下盖子和探针板，倒置于实验台上（如图 A-Figure 3.2，保护探针板上的 sensor 不被损坏）。



A-Figure 3.2 探针板连同盖子一起倒置保护探针

4. 向水化板的每个孔中加入 200μL 无菌水。
5. 向水化板孔两侧的 8 个保护槽中各加入 400μL 无菌水。
NOTE: 水化板结构与 XFp 细胞培养板相同，该操作可参考细胞板部分。
6. 取盖子和探针板，使探针对准水化板各孔，重新放到水化板上还原整个装置，使 Sensor 浸没于无菌水中。
NOTE: 该过程可能会引起 sensor 表面与液体间产生气泡，故在还原装置后可再次上下轻微移动探针板以达到排汽泡的目的
7. 将整个探针板装置放入 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中温育过夜。

NOTE:

- a) 确保培养箱中放置水盘以保证箱中湿度。
- b) 使用载板托盘可以增加探针板装置的稳定性，避免碰翻。

B. 实验当天-上机检测

一. 继续水化探针板（两步法-第二步）

1. 从 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中取出温育 XF 校准液的离心管和探针板装置。
2. 从水化板上取下盖子和探针板，并一同倒置于实验台上。
3. 将水化板各孔及保护槽中的无菌水弃掉。
4. 向水化板的每个孔中加入 200 μ L 预热的 XF 校准液。
5. 向水化板孔两侧的 8 个保护槽中各加入 400 μ L XF 校准液。
6. 将盖子和探针板对准水化板各孔，重新放到水化板上还原整个装置，使 Sensor 浸没于 XF 校准液中。

NOTE: 该过程可能会引起 sensor 表面与校准液间产生气泡，故在还原装置后可再次上下轻微移动探针板以达到排气泡的目的

7. 将整个探针板装置放入 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中水化 45-60min，等待配药。

NOTE: 两步水化法能够尽量避免在过夜孵育期间形成气泡。气泡干扰仪器校准并可能导致负耗氧率 (OCR)。

B. 实验当天-上机检测

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。

NOTE: 本部分内容均以 103010-100 Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit 举例，且检测液中底物浓度为 1mM pyruvate、2mM glutamine 和 10mM glucose。

★ 无需调 pH 的检测液配制方法

请准备以下物品：

- 103575-100 Seahorse 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 (**NOTE:** -20℃保存)

配制方法：

1. 从 103575-100 或 103576-100 中分装出 9.7mL (超净台中进行)，向其中分别加入 100μL glucose、100μL pyruvate、100μL 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)。
2. 将配好的检测液放入 37℃ 无 CO₂ 的细胞培养箱中温育备用 (或 37℃ 水浴后直接使用)。

NOTE:

- a) 检测液现用现配，勿一次性配太多 (Glutamine 需新鲜)。
- b) 对于一块细胞培养板的检测，10mL 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 100μL 或 500μL 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 的检测液的配制方法

请准备以下物品：

- 102353-100 Seahorse XF Base Medium (不同规格有不同货号，见手册前列表)
- 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 (**NOTE:** -20℃保存)

配制方法：

1. 从 102353-100 XF Base Medium 中分装出 9.7mL (超净台中进行)，向其中分别加入 100μL glucose、100μL pyruvate、100μL glutamine 混匀。
2. 将 10mL 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℃ 培养基调至 pH=7.4±0.1。

NOTE:

- 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 μ m 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)。

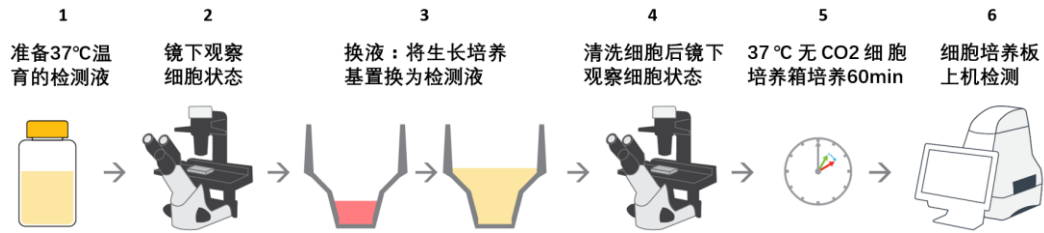
NOTE:

- a) 检测液现用现配, 勿一次性配太多 (Glutamine 需新鲜)。
- b) 对于一块细胞培养板的检测, 10mL 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 100 μ L 或 500 μ L 分装冻存。
- d) 使用 XF base medium (含有酚红) 按该方法配制好的检测液不适用于 103591-100 Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit 和 103346-100 Seahorse XFp Glycolytic Rate Assay Kit 两个实验。

B. 实验当天-上机检测

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

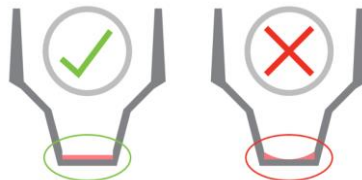
1. 取出温育的检测液，准备为细胞换液。
2. 从 CO₂ 细胞培养箱中取出培养好的贴壁细胞，并在显微镜下观察细胞状态。

NOTE:

- 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。
3. 将细胞培养板所有孔中的生长培养基吸弃 60 μ L 但需剩余 20 μ L。

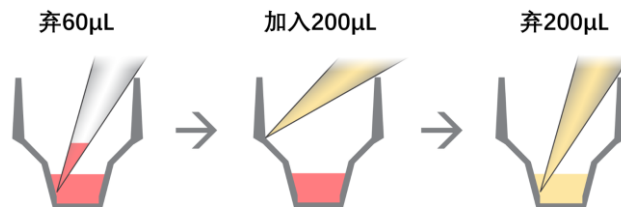
NOTE:

- a) 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，例如孔中只剩 70 μ L，则需从每个孔中吸弃 50 μ L，剩余 20 μ L。
- 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 μ L

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



B-Figure 3.3 细胞换液时注意枪头位置

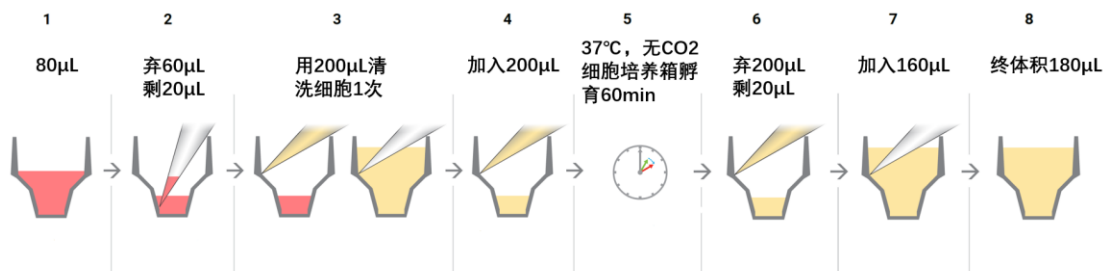
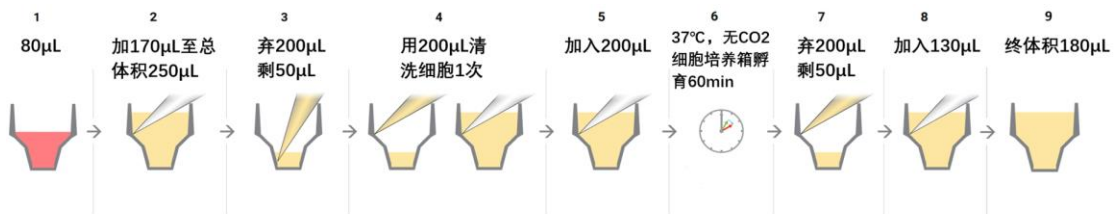
5. 重复上一步操作，孔中剩余 20 μ L 检测液。
6. 向所有孔中加入 160 μ L 检测液，使终体积定为 180 μ L。
7. 在显微镜下观察，以确保换液过程中没有洗掉或划掉细胞造成分布不均。
8. 将细胞培养板放入 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中 60min 等待上机检测。

NOTE:

- a) 通常细胞在 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中培养 45-60min 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气泡。
- 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 20μL 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 103591-100 Seahorse XFP Real-Time ATP Rate Assay Kit 和 103346-100 Seahorse XFP 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 180μL 即可上机。

**B-Figure 3.5 103591-100和103346-100细胞换液流程****B-Figure 3.6 该细胞换液流程适用于黏附力较差贴壁细胞**

◎ 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（NOTE：通常细胞黏附剂除 Cell-Tak™ 外，还可根据需要进行选择 poly-D-Lysine, collagen 等）

1. 用于 Seahorse XFp 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 250μL 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 25μL 该溶液并培养 20 分钟。
4. 使用 200μL 无菌水清洗每个孔两次。
5. Cell-Tak 包被的 Seahorse 细胞培养板在 4℃ 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。

NOTE：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

NOTE：接种细胞之前，应先确定最佳的细胞接种密度。

1. 准备好 37℃ 温育好的检测液。
2. 取 15mL 离心管，加入合适体积固定细胞数的细胞悬液。计算接种细胞总数时，按 10 孔的细胞量计算（如每孔接种 10K 细胞，则 15mL 离心管中细胞总数为 10K cells/well × 10 wells = 100K cells）。
3. 在室温下以 200 × g 离心细胞 5min。
4. 离心细胞时，将已放至室温条件包被 Cell-Tak 的细胞培养板放入载板托盘中固定，并向背景校正孔（A 孔和 H 孔）中加入 50μL 检测液。
5. 将离心后的细胞上清液弃去。
6. 向离心管中加入 500μL 检测液重悬细胞，以得到所需每孔中 50μL 的细胞密度（如每孔接种 10K cells/50μL，则离心管中 10 孔接种量应为 100K cells/500μL）。
7. 将离心机设置更改为零制动。
8. 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。
9. 向细胞培养板中 B-G 孔沿每孔侧壁加入 50μL 细胞悬液，背景校正孔请勿接种细胞。
10. 将细胞培养板放入离心机以 200 × g（零制动）离心细胞板 1min。确保离心机经适当平衡（离心时取载板托盘与废弃的细胞培养板配平，如图 B-Figure 3.7）。



B-Figure 3.7 离心细胞时使用载板托盘并配平

11. 在培养板 A-H 孔两侧的 8 个保护槽中各加入 100μL 无菌水或 PBS，共 800μL。
12. 将细胞培养板放入无 CO₂ 的细胞培养箱，37℃ 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板上。

13. 将 130 μ L 预热的检测液沿每孔侧壁缓慢补加入各细胞孔，注意不要扰乱细胞。
14. 显微镜下观察细胞，确保细胞贴壁。
15. 将细胞板和载板托盘放回无 CO₂ 培养箱中培养 15–25 min。
16. 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 60min。

B. 实验当天-上机检测

四. 配药并加入探针板加药孔 (port) 中

1. 配药-----重悬药物并稀释为工作液 (本部分内容以 103010-100 Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit 为例, 其他 kit 请参考试剂盒的 User guide)

NOTE: 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 XFp 细胞板的检测。
- b) 使用检测液重悬或稀释药物, 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°C 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), 使药物成分溶解。

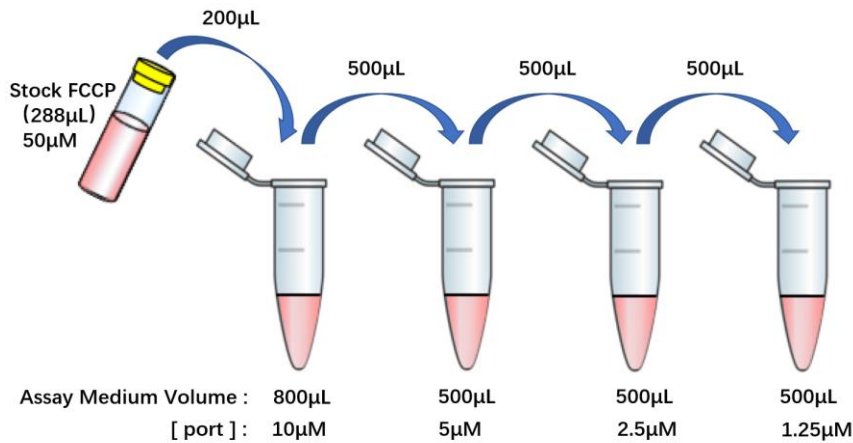
Compound	Volume of assay medium	Stock concentration	Cap color
Oligomycin	280μL	45μM	Blue
FCCP	288μL	50μM	Yellow
Rot/AA	216μL	25μM	Red

- 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 300μL (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°C), 可参照按照下表稀释, 药物工作液准备好后等待加药。

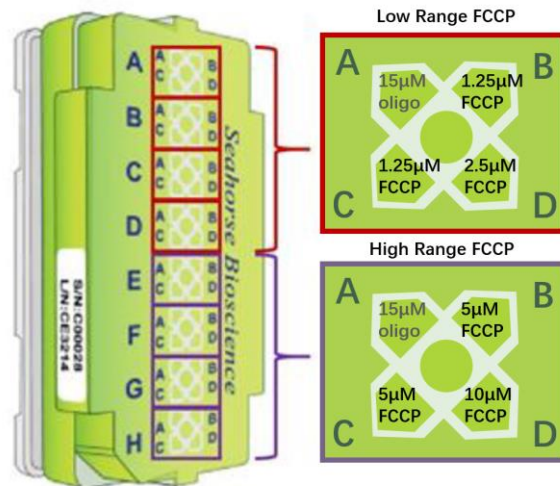
	Final well (μM)	Stock solution volume (μL)	Media volume (μL)	10X (Port) (μM)	Volume added to port (μL)
Port A Oligomycin	0.5	30	240	5	20
	1.5	100	200	15	20
	2.5	150	120	25	20
Port B FCCP	0.125	7.5	292.5	1.25	22
	0.25	15	285	2.5	22
	0.5	30	270	5	22
	1.0	60	240	10	22
	2.0	120	180	20	22
Port C Rot/AA	0.5	60	240	5	25

NOTE:

- 对于大部分细胞系而言, oligomycin 浓度建议 1.5 μ M, Rot/AA 浓度建议 0.5 μ M, 对于所有细胞系的 FCCP 浓度建议进行优化。
- 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。
- FCCP 浓度优化范围需根据实际需要设置, 通常为 0~2 μ M (部分细胞最适 FCCP 浓度可能超过 2 μ M), 可如图 B-Figure 4.2 方法配置浓度梯度溶液。

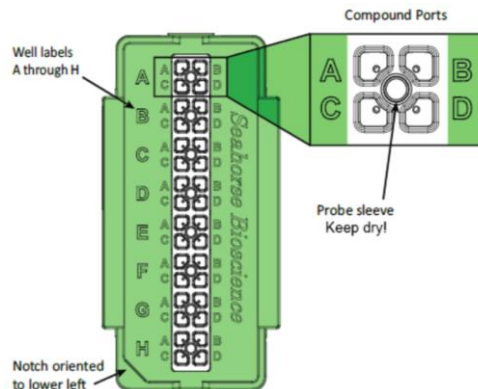
**B-Figure 4.2 FCCP浓度梯度溶液倍比稀释方法**

- 请先优化细胞接种密度后, 再进行 FCCP 浓度优化实验, FCCP 浓度优化实验设置可参考如图 B-Figure 4.3。

**B-Figure 4.3 XFp优化FCCP浓度的加药设计图**

2. 将药物加入探针板加药孔 (port) 中

XFp 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 XFp探针板俯视模拟图

NOTE: 加药前请先阅读该注意事项

- 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, ...)。
- 探针板上同一系列的所有加药孔中都必须加入药物, 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, 那么所有的 D 加药孔都无需加入药物或液体)。
- 加药时, 探针板必须保留在水化板上, 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。
- 加药时请在 XFp 仪器旁进行, 加完药后移动探针板时请小心, 以防药物泄漏。
- 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)。
- 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 4.5, 请参考):

- 从 37°C 无 CO₂ 细胞培养箱中取出水化好的探针板装置, 去除盖子, 保证探针板放置在水化板上。
- 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 20μL, B 加药孔加入 22μL, C 加药孔加入 25μL, D 加药孔加入 27μL)。

NOTE:

- 移液枪头以较小的角度 (小于 5°) 探入加药孔中贴壁加药
- 加药体积取决于加药孔而与药物无关, 待加载的药物溶液均为 10× 浓度。
- 移液枪吸取药物工作液或加载药物时请勿产生气泡。
- 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。
- 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。

3) 检查各加药孔中药物注入情况。

NOTE:

- a) 观察时将探针板移至视线水平位置并保持探针板水平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。

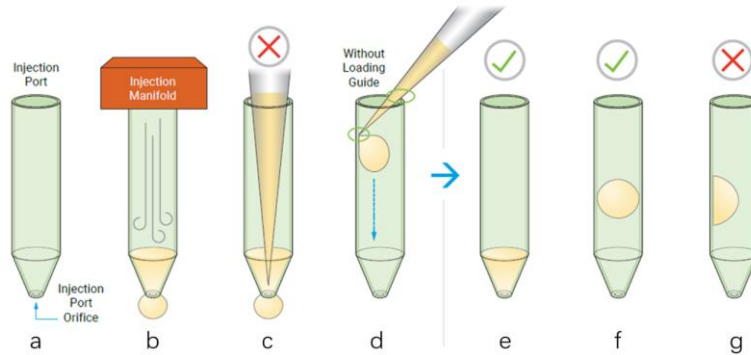
**B-Figure 4.5 加药孔结构及药物加载示范****图 B-Figure 4.5 说明:**

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 为标准示范，加载药物请参看图 d 操作；图 e、f 为药物注入正常；如出现图 g 中情况，会导致药物注射失败。

B. 实验当天-上机检测

五. 上机运行 XF 实验（仪器以 XFp Cell Mito Stress Test Kit 为例）

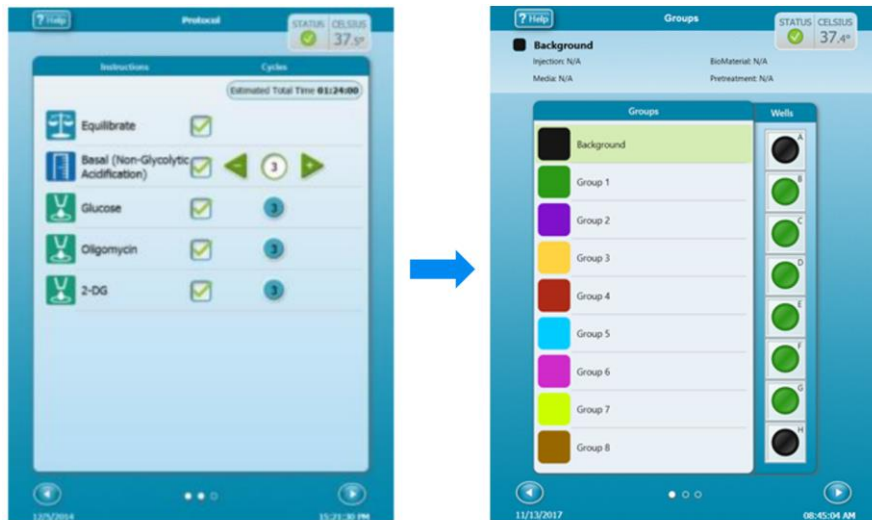
1. 如图 B-Figure 5.1, 在仪器待机界面点击 Start, 进入右侧实验模板界面, 选择对应试剂盒模板后点击界面右下角 Next。

NOTE: 部分试剂盒有两个模板。其中一个模板后标注 (**Acute Injection**), 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。



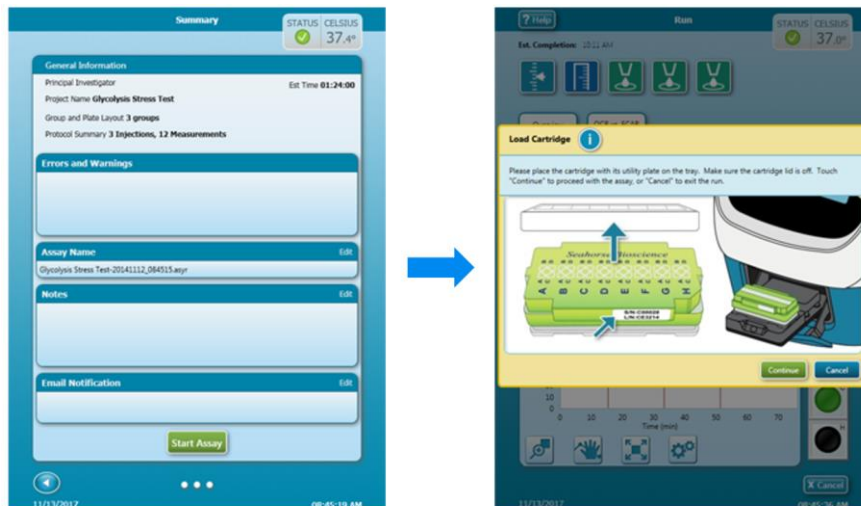
B-Figure 5.1 由仪器待机界面进入实验模板界面

2. 如图 B-Figure 5.2, 进入程序设置界面后, 点击 Next 进入分组界面, 继续点击 Next。



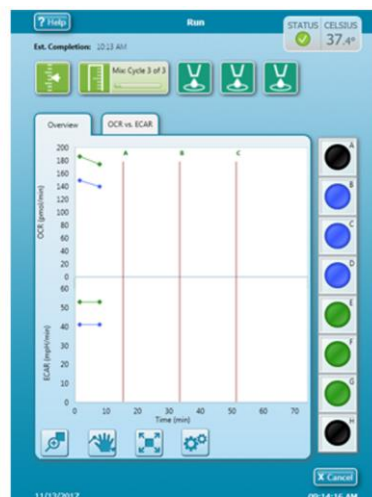
B-Figure 5.2 程序设置界面进入分组界面

3. 如图 B-Figure 5.3, 进入实验启动界面后点击 **Start Assay**, 提示将探针板和水化板组合（必须去掉探针板的盖子）放置于托盘上, 探针板放置方向参考仪器图示, 然后点击 **Continue**, 托盘进入仪器, 开始校准（约 20min）。



B-Figure 5.3 Start Assay后提示放入探针板与工具板开始校准

- 校准完成后，仪器提示将水化板置换为细胞培养板，操作仪器取出水化板，将去掉盖子的细胞培养板，按图示方向放到托盘上加载细胞板，点击 **Continue** 进入数据采集阶段，如图 B-Figure 5.4。



B-Figure 5.4 仪器开始测量细胞代谢

- 测量结束后，操作仪器弹出托盘，取下探针板和细胞培养板，点击 **Continue**，托盘进入仪器。



B-Figure 5.5 测量结束，取下细胞板和探针板

6. 实验结束，可将数据导入 U 盘，使用桌面版 WAVE 软件进行分析。
7. 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，然后对数据进行标准化（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°C 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°C 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°C 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°C 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、水化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, 必须订购 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 45-60min?

细胞培养板在 37°C 无 CO₂ 培养箱中孵育 45-60min 的目的是为了脱气, 释放 CO₂。

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 BSA-palmitate 使其在上机测量时自动注入细胞孔吗?

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, and Cell Tak™ 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. XFp 细胞培养微孔板的每个细胞孔的最大体积是多少?

275 μ L。

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。

13. 加入底物的检测液在多长时间可保持稳定? 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，安捷伦所有试剂盒均经过了能量代谢实验的质量校验及功能验证，可保证实验数据的质量，且分析非期望数据时更容易更便捷，节省时间。

15. Seahorse XF 糖酵解压力试剂盒中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。

16. 为何使用自购的 glucose、pyruvate 和 glutamine 与 Seahorse XF base medium 配制检测液时，调节 pH 时要加很多 NaOH，且 pH 变化非常慢？

可能是由于 glucose、pyruvate 和 glutamine 中存在一些杂质，比如缓冲成分，导致加入 NaOH 后 pH 变化较慢。

17. 为何不能使用 XF base medium 配制的检测液进行 Glycolytic rate 与 real-time ATP rate 两个实验？

XF base medium 中含有酚红，该物质会影响这两个实验的测量。

18. 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。

19. 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。

20. 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。

21. Seahorse 数据分析软件 WAVE 可以免费下载安装吗？

是的，可在安捷伦官网找到 WAVE 下载网址（下一部分内容也列出），并且免费下载安装。

22. Seahorse XFp 仪器模板选项中没有想检测试剂盒的模板怎么办？

可在桌面 wave 软件中将相应实验模板先导出到 U 盘中，再导入 XFp 仪器模板库即可。

23. Seahorse 数据分析软件导出选项中没有 Seahorse real-time ATP rate assay report generator？

当软件导出选项中没有相应的 report generator 时，请移步到 Agilent 官网细胞分析软件下载页面下载对应试剂盒的 report generator。

以上为 XF 实验常见问题，若您想了解各个试剂盒实验遇到的问题，可以阅读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 下载网址。
<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/wave-desktop-2-6>
3. 安捷伦 Seahorse 数据分析软件及 report generator 下载网址。
<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software#0>
4. 安捷伦 Seahorse XF 技术学习中心网址。
<https://www.agilent.com/zh-cn/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay> (中文)
<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay> (英文)
5. 安捷伦 seahorse 细胞参考文献数据库网址（内容可定向搜索）
<https://www.agilent.com/search/?N=4294836537>