

# 安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试 试剂盒

用户指南  
试剂盒 103015-100

# 注意

© 安捷伦科技有限公司, 2019

根据美国和国际版权法, 未经安捷伦公司书面许可, 本书内容不得以任何形式复制 (包括电子存储修改或翻译)。

## 手册部件号

103016-400

## 试剂盒货号

103015-100

## 版本

第二版, 2019 年 5 月  
修订版 G0

美国出版

安捷伦科技有限公司  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610 USA

## 声明

本书内容如有改变, 恕不另行通知。安捷伦科技公司对本材料, 及由此引出的任何商务和特种用途不承担责任。安捷伦科技公司对本手册中可能有的错误或与装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。如果安捷伦与用户对本书中的警告术语有不同的书面协议, 这些术语与本书中的警告术语冲突, 则以协议中的警告术语为准。

## 技术许可

本书对硬件和/或软件的介绍已获得特许, 未经许可, 不得使用或复制。

## 权力限制说明

如果软件用于某一美国政府基本合同或次级合同, 软件的使用将作为下列情况之一被许可: 按照法案 DFAR 252.227-7014 (1995 年 6 月) 确定的“商业计算机软件”; 或者按照法案 FAR 2.101 (a) 确定的“商业条款”; 或者按照法案 FAR 52.227-19 (1987 年 6 月) 确定的“限制计算机软件”; 或者任何相当机构法规或合同条款。软件的使用, 复制或解密受安捷伦科技标准商业许可条款的管理, 美国政府的非 DOD 部门和机构将获得不比法案 FAR 52.227-19 (c) (1-2) (1987 年 6 月) 大的权利。美国政府的用户将获得不比法案 FAR 52.227-14 (c) (1-2) (1987 年 6 月) 或 DFAR 252.227-7015 (b)(2) (1995 年 11 月) 确定的限制权利大的权利, 这一原则适用于任何技术数据。

## 安全警告

### 小心

小心提示表示危险。提醒您在操作过程中注意, 如果执行不当, 将影响产品或丢失重要数据。不要忽视小心提示。

### 警告

警告提示表示危险。提醒您在操作过程中注意, 如果执行不当, 将导致人身伤害或死亡。不要忽视警告提示。

# 目录

## 介绍

实验背景 5

词汇表 8

## 试剂盒信息

试剂盒内容 9

试剂盒的运输和储存 9

额外所需的物品 10

## 实验工作流程

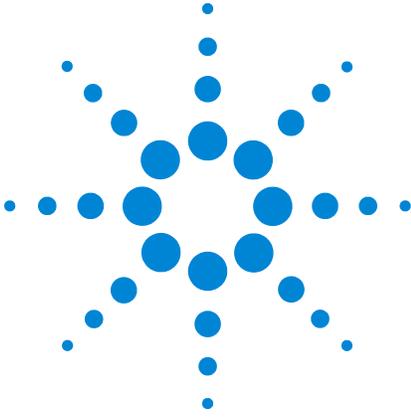
实验前一天 12

实验当天 13

运行实验 16

数据分析 17





# 1 介绍

实验背景	5
词汇表	8

## 实验背景

安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试通过在 Seahorse XFe 和 XF 细胞外流量分析仪上直接测量细胞的氧消耗速率 (OCR) 来表征线粒体功能的关键参数。它是基于培养板的活细胞实验，能够实时监测 OCR。

实验使用 XF 传感器探针板内置的加药孔在实验过程中将呼吸作用的调节剂加入细胞孔中，从而得到反映线粒体功能的关键参数。实验试剂盒里的调节剂为寡霉素 (Oligomycin)、羰基氰-4 (三氟甲氧基) 苯腙 (Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) Phenylhydrazone, FCCP)、鱼藤酮 (Rotenone) 和抗霉素 A (Antimycin A)。第 6 页图 1 阐述了这些调节剂的注射顺序和通过这个实验能够获得的参数。这些参数更详细的描述或定义在第 8 页“词汇表”和第 7 页“参考文献” (Divakaruni 等, 2014) 中提供。



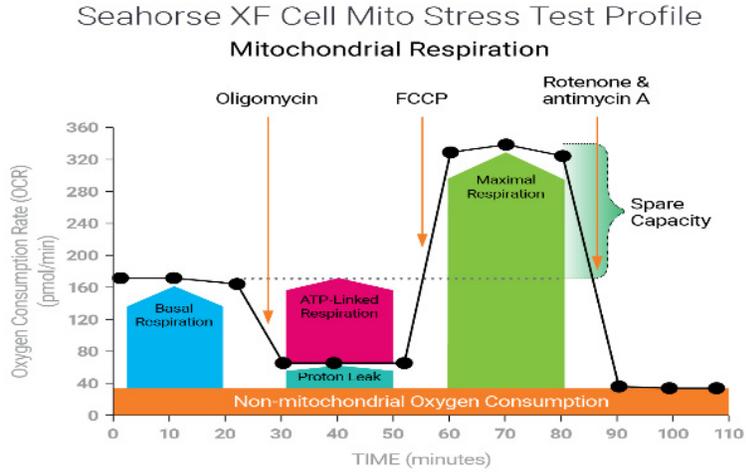


图 1 安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试曲线，展示线粒体功能的关键参数

图 2 阐述电子传递链 (ETC) 复合物，并显示 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒包含的所有调节剂的作用靶点。

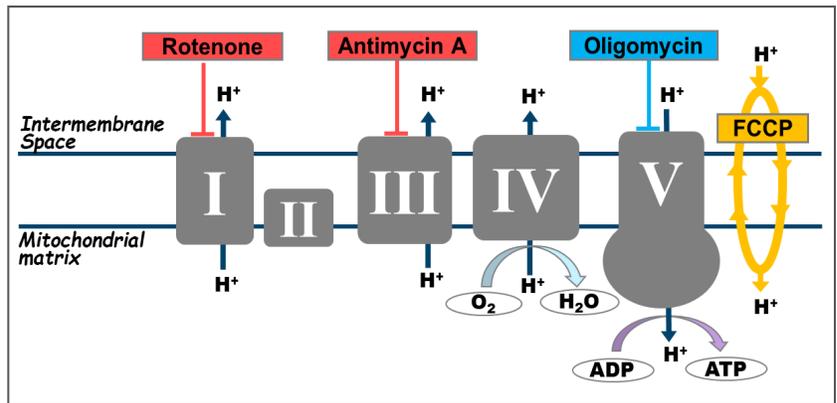


图 2 安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试 ETC 的调节剂寡霉素抑制 ATP 合酶（复合物 V），是实验中在基础测量之后第一次注射的化合物。它影响或减少通过 ETC 的电子流，导致线粒体呼吸或 OCR 减少。减少的 OCR 与细胞 ATP 的产生相关。

羧基氰-4(三氟甲氧基)苯腙 (FCCP) 是一个解偶联剂，它破坏质子梯度和线粒体膜电位。它是寡霉素后第二次注射的化合物。加入的结果是，通过 ETC 的电子流不受限制，复合物 IV 耗氧量达到最大。FCCP 激发的 OCR 可用来计算备用呼吸能力，它的定义是最大呼吸

和基础呼吸的差值。备用呼吸能力衡量细胞对增加的能量需求或压力的反应能力。

第三次注射的是复合物 I 的抑制剂鱼藤酮和复合物 III 的抑制剂抗霉素 A 的混合物。它们联合关闭了线粒体呼吸，从而能够计算由线粒体外的过程驱动的非线粒体呼吸。

表 1 总结了这些化合物的作用效果。

表 1 线粒体呼吸调节剂作用靶点和效果总结

化合物	ETC 靶点	对 OCR 的影响
寡霉素	ATP 合酶（复合物 V）	减少
FCCP	线粒体内膜	增加
鱼藤酮/抗霉素A	分别为复合物 I 和 III	减少

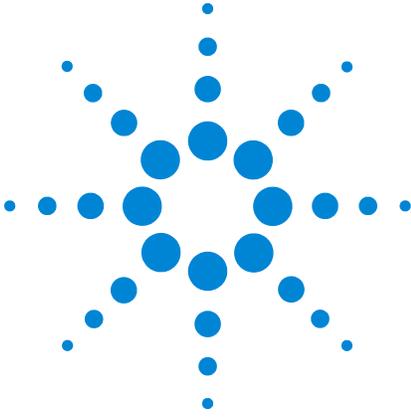
对线粒体功能进行评估使研究人员能够进一步了解代谢在细胞生理学，疾病病理学和病因学中的关键作用。Seahorse XF 细胞线粒体压力测试是测量细胞线粒体功能的金标准，被广泛应用。本实验为了解线粒体功能障碍的原因和深入理解代谢途径，信号和表型提供了视角。

## 参考文献

Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. 2014. Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH data. In *Methods in Enzymology*, Volume 547, Chapter 16, 309-354.

## 词汇表

- **基础呼吸 (Basal respiration):** 用来满足细胞 ATP 需求和线粒体质子渗漏的氧消耗。表示细胞在基础条件下的能量需求
- **ATP 产生 (ATP Production):** 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
- **H<sup>+</sup> (质子) 渗漏 (H<sup>+</sup> (Proton) leak):** 与 ATP 产生不偶联的基础呼吸的剩余部分。质子渗漏可以被看作是线粒体损伤的标志，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):** 这个测量指标表示细胞应对能量需求的能力以及细胞呼吸与其理论最大值的差距。细胞应对能量需求的能力可作为细胞适应性或灵活性的一个指标
- **非线粒体呼吸 (Nonmitochondrial respiration):** 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



## 2 试剂盒信息

试剂盒内容 9  
试剂盒的运输和储存 9  
额外所需的物品 10

### 试剂盒内容

Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒包含 6 个箔袋，每袋包含的试剂足够用于在一块 96 或 24 孔安捷伦细胞培养微孔板上进行一次完整的 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试。每袋包含一管以下化合物：寡霉素、FCCP、鱼藤酮/抗霉素 A 混合物。见表 2。

表 2 安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒箔袋内容

化合物	盖子颜色	每管的量 (nmol)
寡霉素*	蓝色	63
FCCP	黄色	72
鱼藤酮 + 抗霉素 A	红色	27 (每种)

\* 寡霉素是寡霉素 A、B、C 的混合物，寡霉素 A 的含量 > 60%。

### 试剂盒的运输和储存

产品在室温运输。产品可室温保存，从生产日期开始一年内稳定。有效期打印在试剂盒包装的标签上。根据运输日期，用户手中试剂盒实际的保质期在 3-12 个月之间。



## 额外所需的物品

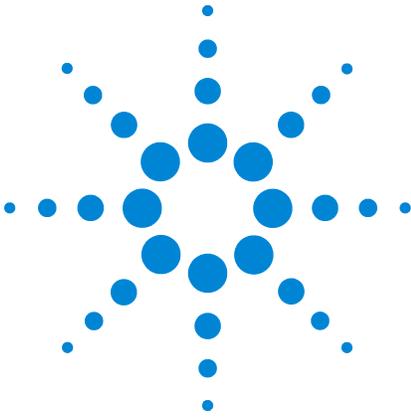
以下物品也是进行 Seahorse XF 线粒体压力测试所需要的，但试剂盒不提供。

物品	供应商	货号
安捷伦 Seahorse XFe/XF 分析仪	安捷伦科技公司	
对于 XFe/XF96 分析仪： XFe96 FluxPak mini 或 XFe96 FluxPak	安捷伦科技公司	102601-100 或 102416-100
对于 XFe24 分析仪： XFe24 FluxPak mini 或 XFe24 FluxPak	安捷伦科技公司	102342-100 或 102340-100
对于 XF24 分析仪： XF24 FluxPak mini 或 XF24 FluxPak	安捷伦科技公司	100867-100 或 100850-100
XF DMEM 培养基，pH 7.4* 或 XF RPMI 培养基，pH 7.4*	安捷伦科技公司	103575-100 103576-100
XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	安捷伦科技公司	103577-100
XF 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液	安捷伦科技公司	103578-100
XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	安捷伦科技公司	103579-100

\* XF DMEM 或 RPMI 培养基也可以作为成套产品（货号 103680-100 和 103681-100）与列在这个表格里的添加剂一起购买。如果需要完整的包括所有培养基类型和我们对于每种实验试剂盒的推荐清单，请参考 Seahorse XF 培养基选择指南。

[https://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5991-7878ZHCN\\_Agilent%20Seahorse%20XF%20Media%20Selection%20Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5991-7878ZHCN_Agilent%20Seahorse%20XF%20Media%20Selection%20Guide.pdf)

推荐使用窄的 p1000 移液枪头来溶解试剂盒管子中的化合物（例如 Fisherbrand SureOne Micropoint Pipet Tips，货号 02-707-402）。



### 3 实验工作流程

实验前一天	12
实验当天	13
运行实验	16
数据分析	17

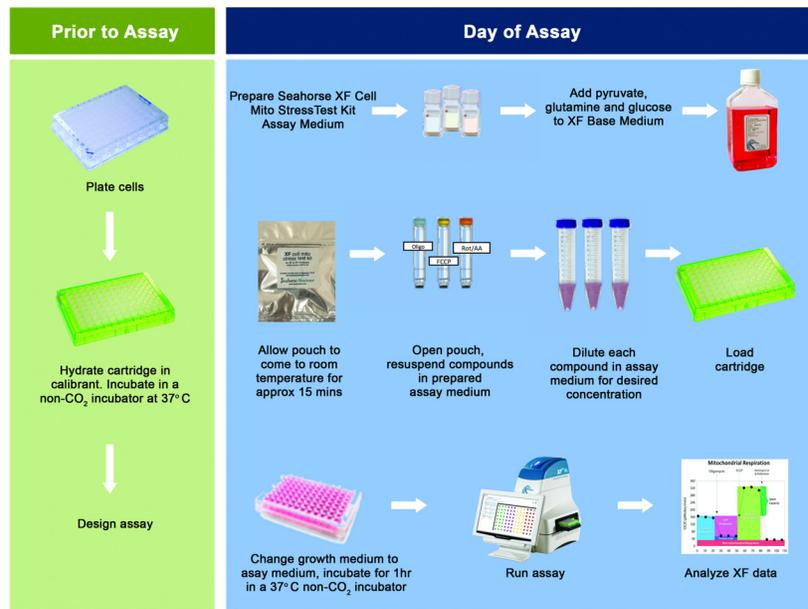


图 3 安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试实验工作流程

#### 注意

您细胞类型最理想的细胞接种密度和 FCCP 的浓度应在实验前根据经验确定。更多详情，请参考安捷伦细胞分析学习中心的基本步骤。

[www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay)

细胞系参考数据库是寻找感兴趣的细胞类型相关信息的好资源。  
[www.agilent.com/cell-reference-database](http://www.agilent.com/cell-reference-database)



## 实验前一天

- 1 打开安捷伦 Seahorse XFe/XF 分析仪，过夜预热（最少 5 个小时）。
- 2 用适当的细胞生长培养基将细胞以预先确定的优化的密度接种到 Seahorse XF 细胞培养微孔板。如果需要更多信息，请参考安捷伦细胞分析学习中心的基本步骤，“Seeding Cells in Seahorse XF Cell Culture Microplates”。  
[www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay)
- 3 在 37°C，无 CO<sub>2</sub> 培养箱中，用 Seahorse XF 校准液水化一块传感器探针板过夜。如果需要更多信息，请参考安捷伦细胞分析学习中心的基本步骤，“Hydrating the Sensor Cartridge”。  
[www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay)
- 4 在 Wave 里设计实验。更多详细信息，请参阅 *仪器用户手册*。

## 实验当天

### 准备检测液

- 1 往 Seahorse XF DMEM 或 RPMI 培养基中补充添加剂准备检测液。推荐 1 mmol/L 丙酮酸钠、2 mmol/L 谷氨酰胺和 10 mmol/L 葡萄糖作为起始。然而，培养基成分可以根据细胞类型或所需的研究条件而改变。如果需要更多信息，请参考安捷伦细胞分析学习中心的基本步骤，“Preparing Assay medium for Use in XF Assays”。  
[www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay)
- 2 将 pH 7.4 的 XF 培养基和 XF 添加剂置于细胞培养超净工作台中。转移足够体积的 XF 培养基到一个无菌的瓶子。在这一步之前无需温热培养基和添加剂。
- 3 加入适当体积的 XF 添加剂获得所需的终浓度。这就是您的检测液。当使用推荐的添加剂浓度时，无需调 pH。
- 4 在水浴中加热检测液到 37°C。准备使用。

### 准备化合物储液和工作液

**重要：**使用当天配制的化合物。丢弃任何剩余的化合物溶液。不要再冻存和重复使用。每袋的材料足够做一整块 96 或 24 孔板的实验。

- 1 从 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒中取出一个箔袋和开盖器。
- 2 打开箔袋，戴手套取出寡霉素（蓝盖）、FCCP（黄盖）和鱼藤酮/抗霉素 A（红盖）三管化合物。将这些管子放在一个小管架上。
- 3 把开盖器的尖部插入盖子的内边缘，轻轻向后旋转这个工具，打开每管的盖子。见第 13 页图 4。



图 4 打开试剂盖

- 4 用准备好的检测液以表 3 所示的体积重悬每管试剂。
- 5 用一支移液枪轻轻地上下吹吸培养基（~10 次）溶解化合物。这是化合物的储液。

表 3 储液

化合物	检测液体积	储液浓度
寡霉素	630 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
FCCP	720 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
鱼藤酮/抗霉素 A	540 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{mol/L}$

## 6 用化合物储液配制工作液，加入探针板上的加药孔中。

推荐使用固定化合物浓度，不同加样体积的方法。这种方法以固定浓度配制工作液，每种化合物以不同的体积加入加药孔。

## 7 每种化合物用检测液配制 2 至 3 mL 工作液，对于 XFe/XF96 分析仪，使用第 14 页表 4 所示的体积；对于 XFe/XF24 分析仪，使用第 15 页表 5 所示的体积。

达到最大效果的最佳化合物终浓度取决于细胞系，可能被检测液类型所影响。因此，对于每一种新细胞系或检测液，推荐进行化合物滴定实验。对于 FCCP 来说尤其重要，因为滴定曲线会非常尖锐，而且过多的 FCCP 实际上会减少 OCR 的反应。按照第 15 页表 5 和表 4 提供的浓度范围来进行实验。对于寡霉素来说，1.5  $\mu\text{M}$  推荐用于大多数细胞，而对于鱼藤酮/抗霉素 A 来说，推荐 0.5  $\mu\text{M}$ 。如有问题，请联系安捷伦细胞分析技术支持。

表 4 加到 XFe/XF96 探针板加药孔的化合物配制。细胞板起始检测液体积为每孔 180  $\mu\text{L}$ 

	细胞孔终浓度 ( $\mu\text{M}$ )	储液体积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液体积 ( $\mu\text{L}$ )	10X (加药孔) ( $\mu\text{M}$ )	加入加药孔的体积 ( $\mu\text{L}$ )
加药孔 A 寡霉素	0.5	150	2850	5	20
	1.5	450	2550	15	20
	2.5	630	1890	25	20
加药孔 B FCCP	0.125	37.5	2962.5	1.25	22
	0.25	75	2925	2.5	22
	0.5	150	2850	5	22
	1.0	300	2700	10	22
	2.0	600	2400	20	22
加药孔 C 鱼藤酮/抗霉素 A	0.5	300	2700	5	25

表 5 加到 XFe/XF24 探针板加药孔的化合物配制。细胞板起始检测液体积为每孔 500  $\mu\text{L}$

	细胞孔浓度 ( $\mu\text{M}$ )	储液体积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液体积 ( $\mu\text{L}$ )	10X (加药孔) ( $\mu\text{M}$ )	加入加药孔的体积 ( $\mu\text{L}$ )
加药孔 A 寡霉素	0.5	150	2850	5	56
	1.5	450	2550	15	56
	2.5	630	1890	25	56
加药孔 B FCCP	0.125	37.5	2962.5	1.25	62
	0.25	75	2925	2.5	62
	0.5	150	2850	5	62
	1.0	300	2700	10	62
	2.0	600	2400	20	62
加药孔 C 鱼藤酮/抗霉素 A	0.5	300	2700	5	69

## 将化合物加入探针板加药孔中

适当的加样技巧可以在安捷伦细胞分析学习中心的基本步骤，“Loading the Sensor Cartridge with Compounds” 中找到。  
[www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay)

请在加化合物之前阅读信息。确保传感器探针板在使用前正确水化。

加药孔的位置，请参考图 5。

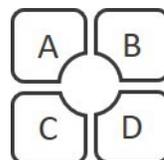


图 5 传感器探针板加药孔的位置和编号

能够进行两种类型的实验：

- **标准实验** — 只注射试剂盒中的调节剂。
- **诱导实验** — 包含一次在寡霉素注射之前额外的测试药物注射，加药孔 A 被用来加测试药物。

参考表 6 来查看不同实验类型化合物的加样体积和指定加药孔。

表 6 实验类型，加药孔和体积推荐。96 孔细胞板检测液的起始体积是每孔 180  $\mu\text{L}$ ，而 24 孔细胞板是每孔 500  $\mu\text{L}$

加药孔	标准实验	诱导实验	加药孔浓度	加入加药孔的体积 ( $\mu\text{L}$ )	
				96 孔	24 孔
A	寡霉素	测试化合物*	10X	20	56
B	FCCP	寡霉素	10X	22	62
C	鱼藤酮/抗霉素 A	FCCP	10X	25	69
D	—	鱼藤酮/抗霉素 A	10X	27	75

\* 对于阴性对照，检测液可以用来替代测试化合物。

## 准备安捷伦 Seahorse XF 细胞培养微孔板

- 1 从 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中取出 Seahorse XF 细胞培养微孔板，在显微镜下检查细胞以确认汇合度。
- 2 从水浴中取出检测液。
- 3 用多通道移液器把细胞培养微孔板中的细胞生长培养基换成预热的检测液，将细胞培养微孔板放入 37°C 无 CO<sub>2</sub> 培养箱中 45 分钟到 1 个小时。

## 运行实验

打开 Wave 检索保存的实验模板文件。按照以下说明：

如果您使用 Wave：

- 1 浏览并打开保存的设计文件。
- 2 点击 **Run**。
- 3 把校准板和已加药的探针板放入仪器的托盘，点击 **Continue**。校准大约需要 15 到 30 分钟。  
注意：移除探针板盖子并确认正确的板放置方向。
- 4 当出现提示时，用细胞培养微孔板替换校准板，然后点击 **Start**。

如果您使用 Wave：

- 1 浏览并打开保存的设计文件，选择 **Review and Run** 标签，然后点击 **Start Run**。
- 2 当出现提示时，把已加药的探针板和校准板放到仪器托盘上，然后点击 **I'm ready**。校准大约需要 15 到 30 分钟。  
注意：移除探针板盖子并确认正确的板放置方向。

- 3 探针板校准结束后，当出现提示时点击 **I'm ready**。
- 4 加载细胞培养微孔板，点击 **I'm ready** 运行实验。

## 数据分析

Seahorse XF 线粒体压力测试报告生成器将 Wave 导出到 Excel 的数据自动计算 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试的参数。Seahorse XF 压力测试报告生成器既可用于标准的压力测试，也可用于诱导的压力测试，提供一份方便、定制化、单页的实验总结。

Seahorse XF 报告生成器可以与 Wave 一起安装，也可以从安捷伦细胞分析网直接下载。访问

<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/seahorse-xf-cell-mito-stress-test-report-generators> 以学习更多关于 Seahorse XF 压力测试报告生成器的信息和下载用户指南。





© 安捷伦科技有限公司

2019 年 5 月，美国出版  
修订版 G0

仅限研究使用。  
不可用于诊断目的



103016-400