

# 安捷伦 Seahorse XF 糖 酵解压力测试试剂盒

用户指南  
试剂盒 103020-100



安捷伦科技公司

# 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

103020-400

## 试剂盒货号

103020-100

## 版本

第二版, 2019 年 10 月

修订版 D0

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

介绍	6
词汇表	7

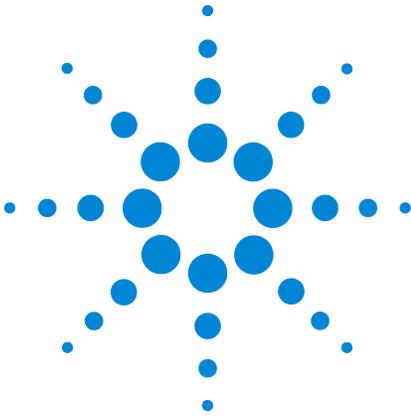
## 试剂盒信息

试剂盒内容	10
试剂盒运输和储存	10
额外所需的物品	11

## 实验

实验前一天	14
实验当天	15
数据分析	20





# 1 介绍

介绍	6
词汇表	8

安捷伦 Seahorse XF 糖酵解压力测试是测量细胞糖酵解功能的标准方法。直接测量细胞外酸化速率 (ECAR), 见第 6 页图 1。Seahorse XF 糖酵解压力测试是一种标准和全面的评估糖酵解通量关键参数的方法: 糖酵解、糖酵解能力、糖酵解储备和非糖酵解的酸化。(详情请参考第 8 页“词汇表”。)

## 介绍

糖酵解和氧化磷酸化是细胞内两条主要的能量生产途径。大多数细胞具有在这两条途径之间转换的能力，从而适应环境的改变。细胞中的葡萄糖 (Glucose) 转变成丙酮酸 (称之为糖酵解)，随后在细胞质中转变成乳酸，或在线粒体中转变成  $\text{CO}_2$  和水。葡萄糖转变成丙酮酸和后来的乳酸，导致质子的净生产并排到细胞外培养基中 (第 7 页图 2)。质子的排出导致细胞周围的培养基酸化。

XF 仪器直接测量酸化速率，以 ECAR 来表示这一指标。以下是实验流程。首先，细胞在无葡萄糖和丙酮酸钠的糖酵解压力测试检测液中孵育，并测量 ECAR。第一次注射的是饱和浓度的葡萄糖。细胞利用加入的葡萄糖并通过糖酵解通路将其分解成丙酮酸，产生 ATP、NADH、水和质子。

质子排出到周围溶液中引起 ECAR 快速增加。这种葡萄糖诱导的反应被称为基础条件下的糖酵解速率。第二次注射的是寡霉素 (Oligomycin)，一种 ATP 合酶的抑制剂。寡霉素抑制线粒体 ATP 的产生，将能量产生途径转换到糖酵解，随后 ECAR 增加显示细胞最大的糖酵解能力。

最后注射 2-脱氧葡萄糖 (2-deoxy-glucose, 2-DG)，一种葡萄糖类似物，通过竞争性结合葡萄糖己糖激酶，糖酵解通路的第一个酶，抑制糖酵解。因此导致的 ECAR 减少证实实验中产生的 ECAR 来源于糖酵解。糖酵解能力和糖酵解速率的差值定义为糖酵解储备。葡萄糖注射之前的 ECAR，被称为非糖酵解的酸化；是细胞除糖酵解之外的过程引起的。

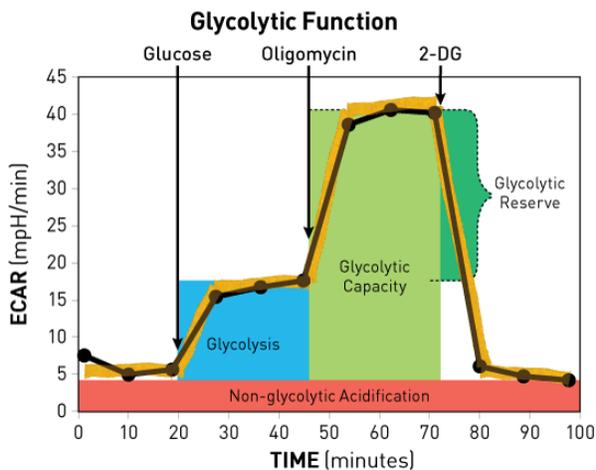
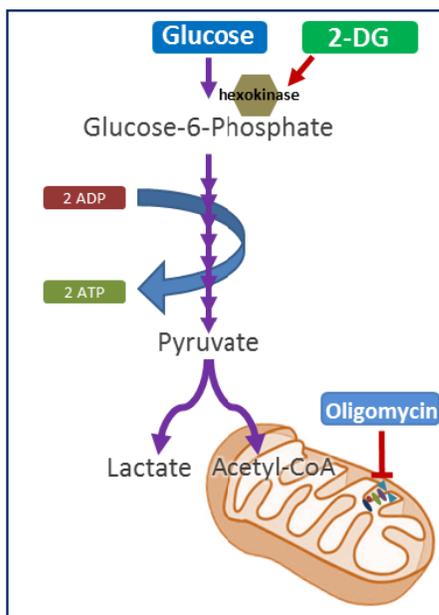


图 1 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解压力测试曲线，展示糖酵解功能的关键参数。依次加入化合物来测量糖酵解、糖酵解能力，并能计算糖酵解储备和非糖酵解酸化



**图 2** 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解压力测试中糖酵解的调节剂。这张图呈现的是糖酵解及试剂盒中化合物作用位点的简化示意图。葡萄糖给糖酵解提供燃料。寡霉素抑制线粒体的 ATP 合酶导致对糖酵解的依赖性增加。2-DG 是一个葡萄糖的竞争性抑制剂，它的功能是关闭糖酵解

**表 1** 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解压力测试试剂（按注射的次序）

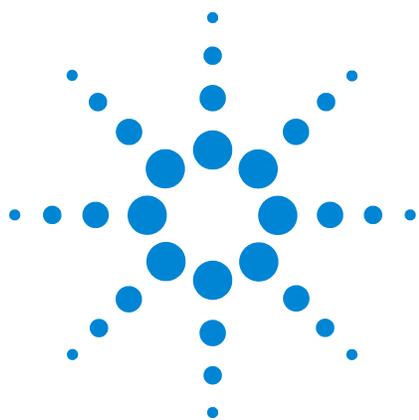
化合物	靶点	对 ECAR 的影响
葡萄糖	糖酵解	增加
寡霉素 <sup>*</sup>	ATP 合酶复合物 V	增加
2-DG <sup>†</sup>	糖酵解	减少

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

† 2-DG 可能看起来清澈、不透明（白色），或是白色固体和清澈液体的混合。

## 词汇表

- **糖酵解:** 葡萄糖转变成丙酮酸的过程。XF 糖酵解压力测试将糖酵解的测量表示为细胞加入饱和浓度的葡萄糖后所达到的 ECAR 速率
- **糖酵解能力:** 测量的是加入寡霉素后细胞达到的最大 ECAR 速率，寡霉素有效关闭氧化磷酸化并驱使细胞利用糖酵解达到最大能力
- **糖酵解储备:** 该测量表示细胞响应能量需求的能力及细胞糖酵解功能与理论最大值的接近程度
- **非糖酵解的酸化:** 测量其他来源的细胞外酸化，而不是来自糖酵解



## 2 试剂盒信息

试剂盒内容	10
试剂盒运输和储存	10
额外所需的物品	11



## 试剂盒内容

Seahorse XF 糖酵解压力测试试剂盒包含 6 个箔袋。每袋包含的试剂足够在一块完整的 96 或 24 孔 XF 细胞培养微孔板上进行一次实验。每袋包含一管以下化合物：葡萄糖、寡霉素和 2-DG。见表 2。

**表 2** 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解压力测试试剂盒内容

化合物	盖子颜色	每管的量
葡萄糖	蓝色	300 $\mu\text{mol}$
寡霉素	浅蓝色	72 nmol
2-DG	绿色	1500 $\mu\text{mol}$

## 试剂盒运输和储存

产品在室温运输，室温保存。

## 额外所需的物品

以下物品也是进行 Seahorse XF 糖酵解压力测试所需要的。试剂盒不提供。

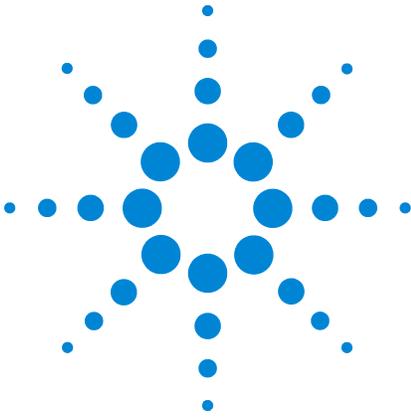
**表 3** 额外所需的物品

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
XF 基础培养基 (500 mL 或 2 L)*	安捷伦科技公司	103334-100 102353-100
XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	安捷伦科技公司	103579-100

\* 如果需要完整的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）

## 试剂盒信息



### 3 实验

实验前一天	14
实验当天	15
数据分析	20

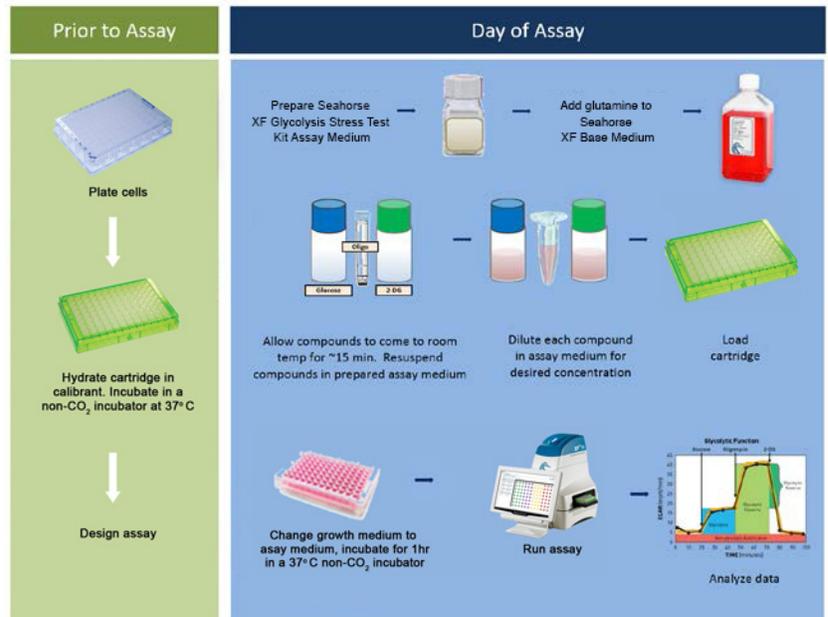


图3 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解压力测试实验工作流程



## 实验前一天

- 1 打开 Seahorse XFe/XF 分析仪，让其升温至稳定。
- 2 用适当的细胞生长培养基将细胞以预先确定的密度接种到 Seahorse XF 微孔板中。（如果需要更多信息，参考基本步骤：<https://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 校准液过夜水化一块传感器探针板。（参考基本步骤：Hydrating the Sensor Cartridge，位于 <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay>）
- 4 在 Wave 里设计实验。访问 <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software>

## 实验当天

### 准备检测液

- 1 往 Seahorse XF 基础培养基补充添加剂准备检测液。安捷伦 Seahorse 推荐 2 mmol/L 谷氨酰胺作为起始条件；然而，需要的培养基组分可以根据细胞类型或体外培养条件而改变。
- 2 加热检测液到 37°C。
- 3 用 0.1 N 的 NaOH 调 pH 到 7.4（注意：安捷伦 Seahorse 推荐调节 pH 后过滤除菌）。
- 4 保持在 37°C 直到准备使用。

### 准备化合物储液

#### 注意

使用当天配制的化合物。不要再冻存。丢弃任何剩余的化合物。

- 1 Seahorse XF 糖酵解压力测试试剂盒包含：

- 6 个箔袋，每袋含有寡霉素
- 6 小瓶葡萄糖
- 6 小瓶 2-DG

试剂盒的试剂足够用 96 或 24 孔 Seahorse XF 细胞培养微孔板做 6 次完整的 XF 糖酵解压力测试。

- 2 从试剂盒中打开一个装有寡霉素（浅蓝色盖子）的箔袋并取出一小瓶葡萄糖（蓝色盖子）和一小瓶 2-DG（绿色盖子）。
- 3 用 p1000 移液器，将准备好的检测液以第 16 页表 4 所示的体积重悬每种组分。轻轻地上下吹吸（~10 次）溶解化合物。涡旋振荡 2-DG 以确保完全溶解。



图 4

#### 移除试剂盖

戴手套的手握住管子，拇指沿着盖子向前滚动来松开盖子，或使用提供的开盖器，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

表 4 配制储液

化合物	检测液体积	储液浓度
葡萄糖	3000 $\mu\text{L}$	100 mmol/L
寡霉素	720 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
2-DG	3000 $\mu\text{L}$	500 mmol/L

## 准备加入探针板加药孔中的化合物

有两种探针板加药的方法：

- 固定加样体积/不同化合物浓度  
这种方法以固定体积的化合物加入每个加药孔，要求每种化合物以不同的浓度配制
- 固定化合物浓度/不同加样体积  
这种方法以固定的浓度配制化合物，要求每种化合物以不同的体积加入加药孔

第 17 页表 6 和表 5 描述如何用这两种方法在探针板上加样。如果使用固定体积的方法，检测液可以直接加到葡萄糖的瓶子。如果使用固定浓度的方法，不需要额外的检测液。对于寡霉素（两种加样方式任选其一）吸取一定体积的储液到一个圆锥管并加入指定体积的检测液。如果进行的是标准实验，2-DG 不需要再添加检测液。

表 5 加到探针板加药孔中的化合物配制

安捷伦 Seahorse XFe/XF96		固定体积					固定浓度				
		细胞孔起始体积：175 $\mu\text{L}$ 检测液					细胞孔起始体积：180 $\mu\text{L}$ 检测液				
加药孔 A 葡萄糖	(细胞孔 孔终浓 度) (mmol/L)	储液 体积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液 体积 ( $\mu\text{L}$ )	8X (加 药孔) (mmol/L)	加入加 药孔的 体积 ( $\mu\text{L}$ )	(细胞 孔终浓 度) (mmol/L)	储液体 积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液 体积 ( $\mu\text{L}$ )	10X (加 药孔) (mmol/L)	加入加 药孔的 体积 ( $\mu\text{L}$ )	
	10	3000	750	80	25	10	3000	0	100	20	
加药孔 B 寡霉素	(细胞孔 孔终浓 度) ( $\mu\text{mol/L}$ )	储液 体积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液 体积 ( $\mu\text{L}$ )	9X (加 药孔) ( $\mu\text{mol/L}$ )	加入加 药孔的 体积 ( $\mu\text{L}$ )	(细胞 孔终浓 度) ( $\mu\text{mol/L}$ )	储液体 积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液 体积 ( $\mu\text{L}$ )	10X (加 药孔) ( $\mu\text{mol/L}$ )	加入加 药孔的 体积 ( $\mu\text{L}$ )	
	1.0	270	2730	9	25	1.0	300	2700	10	22	

表 5 加到探针板加药孔中的化合物配制

安捷伦 Seahorse XFe/XF96		固定体积					固定浓度				
		细胞孔起始体积：175 $\mu$ L 检测液					细胞孔起始体积：180 $\mu$ L 检测液				
加药孔 C 2-脱氧葡萄糖	(细胞孔终浓度) (mmol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	10X (加药孔) (mmol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	(细胞孔终浓度) (mmol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	10X (加药孔) (mmol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	
	50	3000	0	500	25	50	3000	0	500	25	

表 6 加到探针板加药孔中的化合物配制

安捷伦 Seahorse XFe/XF24		固定体积					固定浓度				
		细胞孔起始体积：525 $\mu$ L 检测液					细胞孔起始体积：500 $\mu$ L 检测液				
加药孔 A 葡萄糖	(细胞孔终浓度) (mmol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	8X (加药孔) (mmol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	(细胞孔终浓度) (mmol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	10X (加药孔) (mmol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	
	10	3000	750	80	75	10	3000	0	100	56	
加药孔 B 寡霉素	(细胞孔终浓度) ( $\mu$ mol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	9X (加药孔) ( $\mu$ mol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	(细胞孔终浓度) ( $\mu$ mol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	10X (加药孔) ( $\mu$ mol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	
	1.0	270	2730	9	75	1.0	300	2700	10	62	
加药孔 C 2-脱氧葡萄糖	(细胞孔终浓度) (mmol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	10X (加药孔) (mmol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	(细胞孔终浓度) (mmol/L)	储液体积 ( $\mu$ L)	检测液 体积 ( $\mu$ L)	10X (加药孔) (mmol/L)	加入加药孔的 体积 ( $\mu$ L)	
	50	3000	0	500	75	50	3000	0	500	69	

安捷伦 Seahorse 推荐 1  $\mu$ mol/L 的寡霉素；然而，对于特定的样本条件如有必要浓度是可变的。

## 将化合物加入探针板加药孔中

- **标准实验 – 没有额外的注射：**把化合物加入已水化的探针板上适当的加药孔中：

加药孔 A：葡萄糖

加药孔 B：寡霉素

加药孔 C：2-DG

- **诱导实验 – 包含额外的注射：**在葡萄糖之前注射一种额外的化合物，使用加药孔 A 注射这种化合物，然后加入：

加药孔 B：葡萄糖

加药孔 C：寡霉素

加药孔 D：2-DG

表 7 列出了这种加药方案适合的体积和浓度。

表 7 急性注射化合物的注射体积

加药孔	安捷伦 Seahorse XFe/XF 96 分析仪				安捷伦 Seahorse XFe/XF 24 分析仪			
	固定体积 细胞孔起始体积： 175 $\mu$ L 检测液		固定浓度 细胞孔起始体积： 180 $\mu$ L 检测液		固定体积 细胞孔起始体积： 525 $\mu$ L 检测液		固定浓度 细胞孔起始体积： 500 $\mu$ L 检测液	
A	25 $\mu$ L	8X	20 $\mu$ L	10X	75 $\mu$ L	8X	56 $\mu$ L	10X
B	25 $\mu$ L	9X	22 $\mu$ L	10X	75 $\mu$ L	9X	62 $\mu$ L	10X
C	25 $\mu$ L	10X	25 $\mu$ L	10X	75 $\mu$ L	10X	69 $\mu$ L	10X
D	25 $\mu$ L	11X	27 $\mu$ L	10X	75 $\mu$ L	11X	76 $\mu$ L	10X

## 准备 seahorse XF 细胞培养微孔板

- 1 从 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中取出细胞培养微孔板，并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 使用多通道移液器，将细胞生长培养基换成温热的检测液，然后把细胞培养微孔板放入 37°C 无 CO<sub>2</sub> 培养箱 45 分钟到 1 个小时。

## 运行 Seahorse XF 糖酵解压力测试

打开软件并检索您保存的实验模板文件。对于特定的软件，请遵照以下说明。

### 如果您使用 XF 软件

- 1 浏览并打开保存的设计文件然后点击 **Run**。
- 2 把水化板和已加药的探针板放在仪器托盘上。校准大约需要 15–30 分钟。

注意

移除探针板盖子并确认正确的板放置方向

- 3 当提示出现时，用细胞培养微孔板替换水化板然后点击 **Start**。

注意

移除细胞板盖子并确认正确的板放置方向

### 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 当提示出现时，把已加药的探针板和水化板放入仪器，然后点击 **I'm ready**。校准大约需要 15–30 分钟。

注意

移除探针板盖子并确认正确的板放置方向

- 3 校准结束后，当提示出现时，点击 **I'm ready**。加载细胞培养微孔板，点击 **I'm ready** 以运行实验。

注意

移除细胞板盖子并确认正确的板放置方向

## 数据分析

Seahorse XF 糖酵解压力测试报告生成器将 Wave 导出到 Excel 的数据自动计算 Seahorse XF 糖酵解压力测试的参数。Seahorse XF 糖酵解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页直接下载。访问

[www.agilent.com/en-us/support/cell-analysis-\(seahorse\)/seahorse-xf-report-generators](http://www.agilent.com/en-us/support/cell-analysis-(seahorse)/seahorse-xf-report-generators) 以学习更多关于 Seahorse XF 糖酵解压力报告生成器的信息和下载用户指南。





安捷伦科技公司

© 安捷伦科技有限公司

2019 年 10 月，美国出版  
修订版 D0

仅限研究使用。  
不可用于诊断目的



103020-400