



# 安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定试剂盒

## 用户指南

## 试剂盒 103592-100

与 Seahorse XF/XFe96 和 XFe24 细胞外流量分析仪及相应的 V3 或 V7 PS 细胞培养微孔板一起使用。与其他细胞培养板不兼容。

## 注意

© 安捷伦科技有限公司，2018

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

103592-400 修订版 B0

### 试剂盒货号

103592-100

### 版本

第一版，2018年10月

美国出版

安捷伦科技有限公司  
5301 Stevens Creek Boulevard  
Santa Clara, CA 95051

### 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

## 1 介绍

实验背景	5
糖酵解 ATP 产生速率的计算	7
线粒体 ATP 产生速率的计算	7
词汇表	9

## 2 试剂盒信息

试剂盒内容	11
试剂盒的运输和储存	12
额外需要的安捷伦产品	12

## 3 实验工作流程

实验前一天	14
实验当天	15
准备检测液	15
准备 Seahorse XF 细胞培养微孔板	15
准备化合物储液	16
准备加入探针板加药孔中的化合物	16
将化合物加入探针板加药孔中	16
在 Seahorse XFe 分析仪上加载模板	17
运行 XF 实时 ATP 速率测定	18
使用安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器	19

## 4 常见问题



# 1

## 介绍

实验背景 5

词汇表 9

## 实验背景

细胞三磷酸腺苷 (ATP) 的产生速率是一种描述细胞代谢的信息含量很高的测量，因为 ATP 是细胞内普遍存在的主要能量货币。细胞的代谢调控使细胞根据 ATP 需求的变化调整 ATP 产生的变化来维持总的细胞内 ATP 水平。

安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定被设计用来测量活细胞总的 ATP 产生速率。更重要的是，这个实验能够区分哺乳动物细胞内两条主要的产生 ATP 的代谢途径线粒体氧化磷酸化 (OXPHOS) 和糖酵解 ATP 的产生。

Seahorse XF 实时 ATP 速率测定利用代谢的调节剂（寡霉素 (Oligomycin) 及鱼藤酮 (Rotenone) 和抗霉素 A (Antimycin A) 的混合物，见第 6 页图 1），当连续加药后，可以计算线粒体和糖酵解的 ATP 产生速率。配合 Seahorse XFe24、XF96 或 XFe96 分析仪，Seahorse XF 实时 ATP 速率测定通过提供细胞 ATP 产生速率的实时测量和细胞能量平衡的定量表型，为细胞生物能量学提供了一个新的动态和定量的视角。

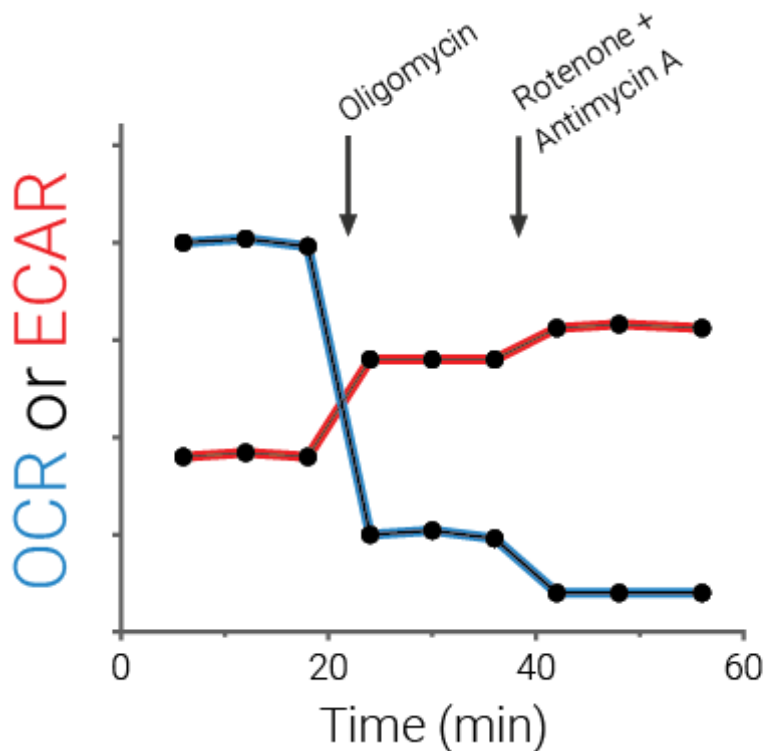


图 1. 安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定方案 – OCR 和 ECAR 测量的动力学曲线。首先测量基础 OCR 和 ECAR。加入寡霉素导致线粒体 ATP 合成受到抑制从而引起 OCR 减少，使 mitoATP 产生速率得以量化。ECAR 数据结合检测液的缓冲系数可以计算总的质子流出速率 (PER)。用鱼藤酮和抗霉素 A 完全抑制线粒体呼吸能够计算线粒体相关的酸化，结合 PER 数据能够计算 glycoATP 产生速率

哺乳动物细胞中，糖酵解和氧化磷酸化 (OXPHOS) 途径提供大部分的细胞 ATP。氧化磷酸化消耗  $O_2$ ，驱动氧气消耗速率 (OCR)，这两条途径都能导致检测液酸化。葡萄糖通过糖酵解转换成乳酸，每分子乳酸伴随着一个  $H^+$  流出，而 TCA 循环使 ETC/氧化磷酸化产生  $CO_2$ ，也会导致检测液酸化。这些反应的总和是细胞外酸化 (ECAR) 变化的主要驱动因素。

## 1 介绍

### 糖酵解 ATP 产生速率的计算

Seahorse XF 技术同时测量 H<sup>+</sup> 产生 (ECAR) 和 O<sub>2</sub> 消耗 (OCR) 的流量。通过获得这些基础条件下和连续添加线粒体抑制剂（寡霉素和鱼藤酮/抗霉素 A）后的数据，总的细胞 ATP 产生速率以及途径特异性的 mitoATP 和 glycoATP 产生速率能够被免标记实时测量。将 OCR 和 ECAR 数据转换成 ATP 产生速率的一系列计算描述如下，在获取数据后使用 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器进行计算。

## 糖酵解 ATP 产生速率的计算

糖酵解途径一分子葡萄糖转换成乳酸的过程中，产生 2 分子 ATP、H<sup>+</sup> 和乳酸（方程式 1）：



考虑到糖酵解途径的化学计量学（方程式 1）、糖酵解途径的 ATP 产生速率（glycoATP 产生速率）等于糖酵解质子流出速率（glycoPER，方程式 2），并且可以用安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定之前验证过的相同方法来计算（有关详细信息，请参阅 [White paper: Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Agilent Seahorse XF Technology](#)）。

$$\text{glycoATP 产生速率 (pmol ATP/min)} = \text{glycoPER (pmol H}^+/\text{min)} \quad (\text{方程式 2})$$

## 线粒体 ATP 产生速率的计算

在 OXOHOS 中与 ATP 产生偶联的氧消耗速率可以通过加入 ATP 合酶抑制剂寡霉素抑制的 OCR 来计算（方程式 3）：

$$\begin{aligned} \text{OCR}_{\text{ATP}} (\text{pmol O}_2/\text{min}) &= \text{OCR} (\text{pmol O}_2/\text{min}) - \\ &\text{OCR}_{\text{Oligo}} (\text{pmol O}_2/\text{min}) \end{aligned} \quad (\text{方程式 3})$$

从 OCR<sub>ATP</sub> 转换为线粒体 ATP 产生速率包括：乘以 2 将 O<sub>2</sub> 分子转变成消耗的氧 (O) 原子，然后乘以 P/O 值，即一对电子通过电子传递链每还原一个氧原子，磷酸化为 ATP 的 ADP 分子数（方程式 4）。

Seahorse XF 实时 ATP 速率测定在这些计算中使用的平均 P/O 值为 2.75，这个值在多种细胞不同底物可用性的条件下都得到验证，能够准确反映实验条件（参阅 [White Paper: Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology](#)）。

基于这些考虑，线粒体 ATP 产生速率根据方程式 4 计算：

$$\begin{aligned} \text{mitoATP 产生速率 (pmol ATP/min)} &= \text{OCR}_{\text{ATP}} (\text{pmol O}_2/\text{min}) * \\ &2 (\text{pmol O}/\text{pmol O}_2) * \text{P/O} (\text{pmol ATP}/\text{pmol O}) \end{aligned} \quad (\text{方程式 4})$$

## 1 介绍

### 线粒体 ATP 产生速率的计算

最后，总的细胞 ATP 产生速率（**方程式 5**）是糖酵解和线粒体 ATP 产生速率的和：

$$\text{ATP 产生速率 (pmol ATP/min)} = \text{glycoATP 产生速率 (pmol ATP/min)} + \text{mitoATP 产生速率 (pmol ATP/min)} \quad (\text{方程式 5})$$

## 词汇表

- **glycoATP 产生速率 (glycoATP Production Rate):** 糖酵解途径中葡萄糖转变成乳酸相关的 ATP 产生速率 (以 pmol ATP/min 来表示)
- **mitoATP 产生速率 (mitoATP Production Rate):** 线粒体氧化磷酸化相关的 ATP 产生速率 (以 pmol ATP/min 来表示)
- **总的 ATP 产生速率 (Total ATP Production Rate):** 活细胞在适当的实验条件下线粒体 ATP 产生速率和糖酵解 ATP 产生速率之和
- **P/O 值 (P/O ratio):** 一对电子通过线粒体电子传递链每还原一个氧原子 (O) 合成的 ATP 分子数 (即磷酸化为 ATP 的 ADP 摩尔数)
- **XF ATP 速率指数 (XF ATP Rate Index):** 在一定时间点, mitoATP 产生速率除以 glycoATP 的比值。这是一个有价值的检测代谢表型变化和/或差异的指标。XF ATP 速率指数的增加表示更多的氧化/更少的糖酵解表型, 反之亦然
- **诱导实验 (Induced Assay):** XF 实时 ATP 速率测定工作流程包含一次在连续注射寡霉素和鱼藤酮/抗霉素 A 之前的实验化合物急性注射。此工作流程能够测量 ATP 产生的原位激活或抑制, 以及 XF ATP 速率指数 (mitoATP 产生速率/glycoATP 产生速率) 的实时改变
- **缓冲系数 (Buffer Factor):** B 测量系统的缓冲能力, 包括检测液和 XF 实验条件 (仪器、探针、实验耗材)
- **糖酵解 (Glycolysis):** 在 Seahorse XF 实验中, 由葡萄糖转变成乳酸的过程
- **质子流出速率 (Proton Efflux Rate):** 随着时间的推移, 细胞排出到检测液中的质子数, 以 pmol/min 来表示
- **糖酵解质子流出速率 (Glycolytic Proton Efflux Rate):** 来源于糖酵解的质子流出速率 (扣除 CO<sub>2</sub> 依赖的酸化的影响)。这个测量指标与细胞外乳酸的产生速率高度相关
- **ATP 偶联的呼吸 (ATP coupled respiration):** 基础呼吸中被用来驱动 ATP 产生的部分。通过注射 ATP 合酶抑制剂寡霉素进行定量

# 1 介绍

## 词汇表

## 2

# 试剂盒信息

试剂盒内容	11
试剂盒的运输和储存	12
额外需要的安捷伦产品	12

## 试剂盒内容

Seahorse XF 实时 ATP 速率测定试剂盒包含 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 Seahorse XF 细胞培养微孔板进行一次完整的 XF 实时 ATP 速率测定。

每袋包含一管寡霉素和一管鱼藤酮 + 抗霉素 A 的混合物（见表 1）。

**表 1**      **XF 实时 ATP 速率测定试剂盒内容**

化合物	靶点	盖子颜色	每管的量
寡霉素	ATP 合酶抑制剂（复合物 V）	蓝色	63 nmol
鱼藤酮 + 抗霉素 A (Rot/AA)	分别为线粒体 ETC 复合物 I 和 III	红色	每个 27 nmol

## 试剂盒的运输和储存

产品在室温运输，可以在室温储存。产品自生产日期开始起 18 个月内保持稳定（标在盒子上）。

## 额外需要的安捷伦产品

以下安捷伦产品也是进行 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定所需要的，但试剂盒不提供。有关进行 XF 试验所需材料的完整清单，请访问网站上运行 XF 实验的基本步骤

<http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay>

物品	供应商	货号
Seahorse XF96、XFe96 或 XFe24 分析仪 与 <b>XF24</b> 或 <b>XF24-3</b> 分析仪不兼容	安捷伦科技公司	
XFe96 和 XF96 分析仪配套的 V3 PS 细胞培养微孔板 或 XFe24 分析仪配套的 V7 PS 细胞培养微孔板	安捷伦科技公司	101085-004 100777-004
Seahorse XF DMEM 培养基，pH 7.4 或 Seahorse XF RPMI 培养基，pH 7.4	安捷伦科技公司	103575-100 103576-100
使用的分析仪配套的 Seahorse XF FluxPak	安捷伦科技公司	各种
Seahorse XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	安捷伦科技公司	103577-100
Seahorse XF 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液	安捷伦科技公司	103578-100
Seahorse XF 200 mmol/L L- 谷氨酰胺溶液	安捷伦科技公司	103579-100

# 3

# 实验工作流程

实验前一天 14

实验当天 15

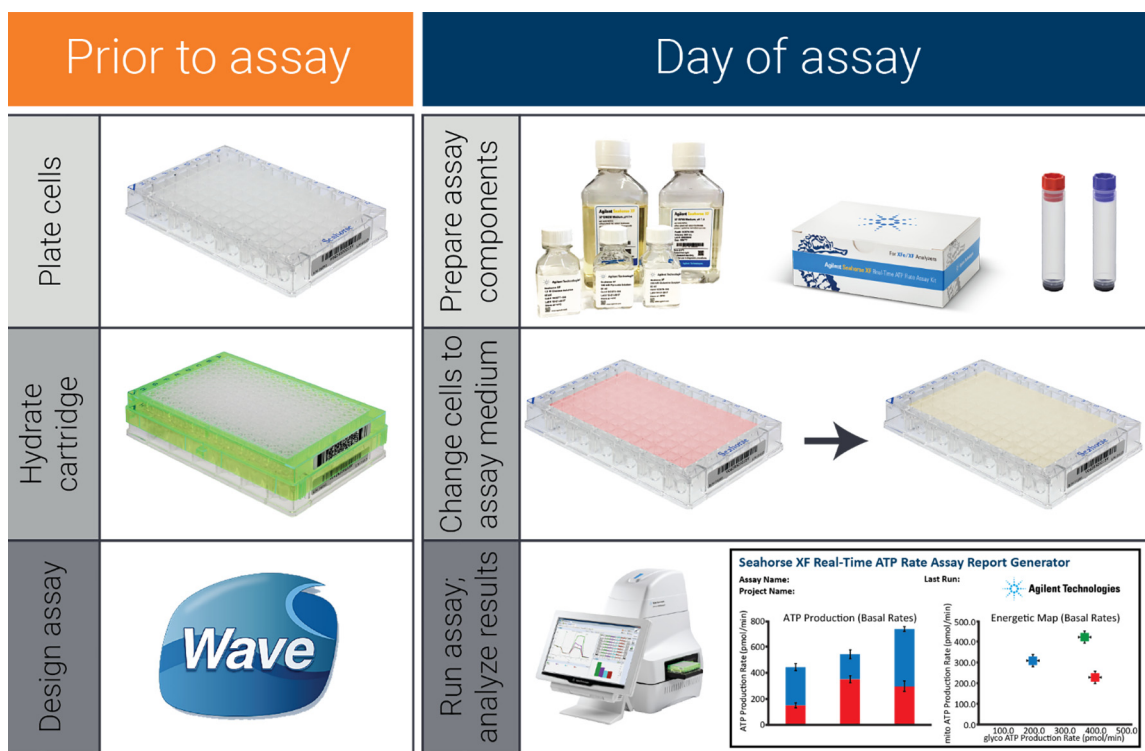


图 2. 安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定工作流程

## 实验前一天

- 1 打开 Seahorse XFe/XF96 或 XFe24 分析仪，使温度稳定。
- 2 对于贴壁细胞，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。请参考运行 XF 实验的基本步骤，详细信息位于 [http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-\(seahorse\)/basic-procedures-to-run-an-xf-assay](http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-(seahorse)/basic-procedures-to-run-an-xf-assay)。  
对于悬浮细胞，见以下章节：实验当天/准备 Seahorse XF 细胞培养微孔板。
- 3 在 37°C 无 CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜水化探针板（参考基本步骤）。
- 4 在 Wave 里设计实验或使用 ATP 产生速率实验模板（标准或诱导的实验）。根据特定实验设计，对模板进行必要的分组修改。

## 实验当天

### 准备检测液

- 1 无菌条件下，往 100 mL Seahorse XF DMEM 培养基，pH 7.4 中添加 10 mmol/L XF 葡萄糖、1 mmol/L XF 丙酮酸钠、2 mmol/L XF 谷氨酰胺。这些是推荐的起始条件；然而，所需的检测液组分可根据细胞类型或体外培养条件而改变。
- 2 温热检测液到 37°C。
- 3 37°C 孵育直至准备使用。

#### 注意

如果检测液与此配方有显著不同（即更高浓度的 XF 葡萄糖、XF 丙酮酸钠或 XF 谷氨酰胺和/或其他培养基添加剂），如有必要，检查检测液的 pH 值并调至 7.4，需按照 **Buffer Factor Protocol** 测定缓冲系数值。查阅 **Seahorse XF Buffer Factor Protocol User Guide**。

### 准备 Seahorse XF 细胞培养微孔板

对于贴壁细胞，

- 1 从 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中取出细胞培养微孔板，在显微镜下检查细胞以确认种板的一致性和正常的细胞形态。
- 2 弃去细胞培养微孔板中的细胞生长培养基。使用多通道移液器用预热的检测液洗细胞一次，然后置于 37°C 无 CO<sub>2</sub> 培养箱中用检测液孵育 45-60 分钟。
- 3 在开始 XF 实验前，再次弃去检测液并在每孔加入新鲜，预热的检测液（见第 17 页表 4 解合适的起始体积）。

对于悬浮细胞，

- 1 从生长培养基中沉淀细胞，并用预热的检测液重悬。
- 2 计数细胞，以这样一个浓度悬浮细胞，即 50  $\mu$ L (XF96/XFe96) 或 100  $\mu$ L (XFe24) 细胞包含每孔所需要的细胞数，留 4 个没有细胞的孔作为背景校正孔。
- 3 加入所需的细胞/孔，然后温和地离心使细胞贴壁。
- 4 每孔轻轻加入检测液。总体积应与第 17 页表 4 所示相应的细胞孔起始体积一致。
- 5 实验前将板子放在 37°C 无 CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 45-60 分钟。

## 准备化合物储液

### 注意

使用当天配制的化合物。不要冻存。丢弃任何剩余的化合物。

- 1 从试剂盒中取出一个铝箔包，然后打开袋子并取出寡霉素（蓝色盖子）和鱼藤酮/抗霉素 A（红色盖子）管。
- 2 轻弹管子确保在打开管子前粉末在管子底部。
- 3 按照表 2，用适当体积的检测液重悬每种组分。旋涡震荡 ~1 分钟以确保化合物完全重悬。

表 2 储液

化合物	检测液体积	储液浓度
寡霉素	420 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{mol/L}$
鱼藤酮 + 抗霉素 A	540 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{mol/L}$

## 准备加入探针板加药孔中的化合物

如表 3 所述，每种化合物各用检测液配制 3 mL。推荐使用 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的寡霉素和 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的鱼藤酮 + 抗霉素 A（终浓度）。

表 3 化合物的配制，用于在 XF96、XFe96 或 XFe24 分析仪上进行 XF 实时 ATP 速率测定

	储液体积 ( $\mu\text{L}$ )	检测液体积 ( $\mu\text{L}$ )	10X [加药孔] ( $\mu\text{mol/L}$ )	[细胞孔] ( $\mu\text{mol/L}$ )
加药孔 A 寡霉素	300	2700	15	1.5
加药孔 B Rot/AA	300	2700	5	0.5

### 3 实验工作流程

将化合物加入探针板加药孔中

## 将化合物加入探针板加药孔中

- **标准实验** – 在寡霉素和鱼藤酮/抗霉素 A 之前没有急性注射。将化合物加入已水化的探针板加药孔中：

加药孔 A: 寡霉素

加药孔 B: 鱼藤酮/抗霉素 A

- **诱导实验** – 注射一种测试化合物，加入加药孔 A 中，按如下所示：

加药孔 A: 实验化合物（急性注射）或溶剂对照

加药孔 B: 寡霉素

加药孔 C: 鱼藤酮/抗霉素 A

第 17 页表 4 列出了使用两个或多个加药孔时，加药的合适体积和浓度方案。

表 4 细胞孔检测液起始体积和化合物加入体积

		安捷伦 Seahorse XFe/XF96 分析仪	安捷伦 Seahorse XFe24 分析仪	
		细胞孔起始体积： 180 $\mu$ L 检测液	细胞孔起始体积： 500 $\mu$ L 检测液	
加药孔	体积	浓度	体积	浓度
A	20 $\mu$ L	10X	56 $\mu$ L	10X
B	22 $\mu$ L	10X	62 $\mu$ L	10X
C	25 $\mu$ L	10X	69 $\mu$ L	10X
D	27 $\mu$ L	10X	75 $\mu$ L	10X

### 3 实验工作流程

在 Seahorse XFe 分析仪上加载模板

## 在 Seahorse XFe 分析仪上加载模板

(如果模板已经存在, 请跳过这一步。)

个人电脑 (需要接入互联网)

- 1 从安捷伦科技网站下载 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器。XF 实时 ATP 速率测定标准和诱导实验的模板都包含在下载文件夹里。

### 注意

当注册下载报告生成器和相应的实验模板时, 选择恰当的 **Seahorse XFe 分析仪 (Seahorse XFe96 或 XFe24)**。

- 2 转移到一个 USB 或驱动器或网络驱动器 (如果 Seahorse XFe 分析仪已联网)。

### Seahorse XFe96/XFe24 分析仪

- 1 把 USB 驱动器插入前置 USB 接口并等待 ~10 秒钟。
- 2 点击 **Import** (New Assay 视图的底部)。
- 3 在 USB 或网络驱动器上定位到实验模板。
- 4 点击 Windows 对话框中的 **Open**。
- 5 如果需要的话, 导入下一个模板。
- 6 导入的实验模板在可用的模板列表中可供选择。拔出 USB。

## 运行 XF 实时 ATP 速率测定

- 1 从可用模板列表中选择 **Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay** 或 **Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay (Induced Assay)** 模板, 然后点击 **Open File** (或双击模板)。
- 2 **Group Definitions:** 确认或修改默认的实验组别和条件。
- 3 **Plate Map:** 确认或修改实验分组。
- 4 **Protocol:** 确认或修改仪器运行程序。
- 5 **Run Assay:** 准备好了点击 **Start Run**。
- 6 当提示出现时, 把已加药的探针板和校准板放入 Seahorse XFe 分析仪, 然后点击 **I'm Ready**。校准大约需要 15-30 分钟。

### 3 实验工作流程

#### 运行 XF 实时 ATP 速率测定

##### 注意

移除探针板盖子并确认正确的板放置方向。

- 7 完成校准以后，Wave 控制器将显示一个加载细胞板的信息。点击 **Open Tray** 来弹出校准板并加载细胞板。确保在加载前取下细胞板盖子。
- 8 点击 **Load Cell Plate** 运行实验。

### 3 实验工作流程

使用安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器

## 使用安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器

安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器自动计算 XF 实时 ATP 速率测定的参数（mitoATP 产生速率、glycoATP 产生速率、总的 ATP 产生速率、XF ATP 速率指数、% 糖酵解和 % 氧化磷酸化）。Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器既可以用于标准实验也可用于诱导实验，提供一份方便的单页实验总结。

报告生成器可以从安捷伦网站下载。请访问

<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/xf-real-time-atp-rate-assay-report-generator> 来了解更多关于 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定报告生成器和下载用户指南。

- 1 实验结束后，打开 Wave Desktop 或 Wave Controller 里您的文件。
- 2 打开 Overview 选项，查看 OCR 和 PER 数据。确认检测液和缓冲系数被分配到了每组，包括背景孔。
- 3 点击 **Export** 选项并选择 **Microsoft Excel** 将完成的运行以 .xlsx 文件导出。
- 4 加载 XF 实时 ATP 速率测定报告生成器里的数据文件并选择要显示的组。如果实验有多于 3 次的注射加药，选择是否有一次急性注射，哪次注射对应寡霉素。Rot/AA 将被自动分配为在寡霉素之后加入。
- 5 点击 **Update Summary** 来获得 XF 实时 ATP 速率测定报告。

更多详情，请查阅 [Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay Report Generator User Guide](#)。

观看一个简短的使用 XF ATP 速率实验报告生成器逐步进行数据分析的教学视频。

<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/analyze-xf-real-time-atp-rate-assay>

如果检测液中含有不同的氧化底物（不同的 P/O 值），mitoATP 产生速率如何计算？

为了将 ATP 偶联的呼吸转换为线粒体的 ATP 产生速率，在电子传递链末端每还原一个氧原子，ADP 磷酸化为 ATP 的化学计量学必须得到确定。不同的底物理论上最大的 P/O 值不同，并且依赖于化学计量学/底物氧化通路，以及 F1F0 ATP 合酶的效率。在标准的 XF 实验条件下，细胞被供给底物混合物（主要是葡萄糖、丙酮酸和谷氨酰胺），且通常内源性底物储备（糖原、脂肪酸、其他氨基酸）可用于线粒体氧化。因此，用几种细胞系进行了测试并确认 P/O 值 2.75 准确代表了外源性和内外源性氧化底物混合物的平均 P/O 值。如需更多信息，请参阅白皮书：<https://seahorseinfo.agilent.com/acton/fs/blocks/showLandingPage/a/10967/p/p-0157/t/page/fm/1>

当进行诱导的 XF 实时 ATP 速率测定时，诱导的速率是如何计算和报告的？

在 XF 实时 ATP 速率诱导实验中 Summary Printout 和 Measure Sheet 中的 Average Assay Parameter Calculations 显示的 Induced Rate(s) 是用急性注射和寡霉素注射之间所有测量的平均值计算的。然而，每个时间点的诱导速率可以从 Kinetic Rate Data (Measure Sheet) 中获得。

**XF 实时 ATP 速率测定中定义的 XF ATP 速率指数是什么？**

XF ATP 速率指数是 mitoATP 产生速率与 glycoATP 产生速率的比值（即 mitoATP rate/glycoATP rate）。这个比值是一个细胞代谢表型的定量指标。代谢指数大于 1 代表大于 50% 的细胞 ATP 来自线粒体的 ETC/ 氧化磷酸化，而指数小于 1 表示大于 50% 的总 ATP 是糖酵解途径产生的。因为代谢指数是比值测量，所以它对于代谢表型的改变或转换是高度敏感的。

**为什么相同的细胞类型当细胞以不同的密度种板时 XF ATP 速率不一样？**

细胞的代谢表型会被细胞对 ATP 的需求所影响。一般来说，处于增殖或分化中的细胞比融合（缓慢生长）或末端分化的细胞拥有更高的糖酵解速率。为了比较实验之间的结果，推荐在整个研究过程中保持一致的细胞培养条件和细胞接种密度。

为什么必须用 **Seahorse XF DMEM 培养基, pH 7.4** 或 **Seahorse XF RPMI 培养基, pH 7.4** 来进行这个实验?

此外,使用预调 pH 到 7.4 的 XF DMEM 或 XF RPMI 培养基节省了实验准备的时间,确保 XF 实验过程中一致的检测液 pH 值。GlycoATP 产生速率的计算需要对 XF 实时 ATP 速率测定中的糖酵解质子流出速率进行绝对测量。为了正确计算 PER,检测液必须要有一个固定的缓冲能力。培养基中低浓度的 HEPES 在实验的时间范围内提供了一致的缓冲能力值。虽然添加 HEPES 缓冲液轻微地减少了 ECAR 信号,但是它显著提高了 ECAR 数据的质量和一致性,以及转换为 PER 的准确性(更多详情,请参阅 [White paper: Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Agilent Seahorse XF Technology](#))。

我能够使用其他的 **Seahorse XF 检测液**来运行 **XF 实时 ATP 速率测定**吗?

GlycoATP 产生速率的准确计算需要使用一种没有酚红和碳酸氢钠且低浓度 HEPES 缓冲液的检测液。因此,强烈推荐使用安捷伦 Seahorse XF DMEM (或 RPMI), pH 7.4 的培养基。任何偏离推荐的培养基和补充剂(葡萄糖、丙酮酸钠、谷氨酰胺),需要根据经验(使用 XF 分析仪)确定每个实验的缓冲系数(参阅 Seahorse XF Buffer Factor Protocol 以进一步了解信息)。任何含有酚红的检测液不能在 XF 实时 ATP 速率测定中使用。

当运行诱导的 **XF 实时 ATP 速率测定**时,寡霉素注射之后的 **OCR 高于基础 OCR**,发生了什么?

在寡霉素注射之前加入的化合物使电子传递与氧化磷酸化解偶联(如 FCCP、DNP 等等),通常会导致 OCR 增加。然而,这种呼吸不与 ATP 的产生偶联,因为没有 ATP 合酶的参与,线粒体膜电位会减少或消除,所以在这种环境下很少或没有 ATP 生成。在这些情况下,基础的 mitoATP 产生速率不能够被准确计算。如果怀疑存在解偶联化合物,那么推荐添加一组对照组,注射检测液 + 溶剂来计算基础的 mitoATP 产生速率。

## 4 常见问题

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。  
不可用于诊断目的。

© 安捷伦科技有限公司，2018

第一版，2018年10月



103592-400 修订版 B0

