

安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒

用户指南
试剂盒 103344-100

注意

© Agilent Technologies, Inc. 2019

根据美国和国际版权法的规定，未经 Agilent Technologies, Inc. 事先允许和书面同意，不得通过任何方式、以任何形式复制本使用手册的任何部分（包括电子存储和检索，或翻译成一种外国语言）。

使用手册型号

103344-400

试剂盒型号

103344-100

版本

第二版，2019年5月

修订版 E0

中国出版

安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808-1610 USA

保证

本文件所载的资料按“现状”提供，在后期版本中如对其进行变更，恕不另行通知。此外，在适用法律允许的最大范围内，对于本手册和其中所含任何信息中所有明示或暗示的条款，包括任何适销性、针对特定用途的适用性的暗示保证，Agilent 均不提供任何担保。Agilent 不对任何与提供、使用或履行本文件或本文件所载的任何信息相关的错误或者伴随或后果性损害负责。如果 Agilent 和用户签订过关于保证条款的单独的书面协议，且本文件中包括与这些条款相抵触的条款，则以单独协议中的保证条款为准。

技术许可

本文件中所述硬件和/或软件是根据许可证提供的，并且只能根据该许可证中的条款使用或复制。

受限权利说明

如果软件是供履行美国政府采购主合同或分包合同时使用，可根据 DFAR 252.227-7014（1995年6月）中的定义，作为“商业计算机软件”，或者按照 FAR 2.101(a) 中的定义，作为一个“商业项目”，或 FAR 52.227-19（1987年6月）中的定义或任何同等机构的规定或合同条款，作为“受限计算机软件”对软件进行交付和授权许可。对软件的使用、复制或公开受 Agilent Technologies 的标准商业许可证条款制约，美国政府的非国防部门 (non-DOD) 和机构仅可得到根据 FAR 52.227-19(c)(1-2)（1987年6月）中定义的受限权利。美国政府的用户仅可得到根据 FAR 52.227-14（1987年6月）或 DFAR 252.227-7015 (b)(2)（1995年11月）中定义的受限权利，适用于任何技术资料。

安全提示

注意事项

注意事项 提示表示存在危险。提示在操作过程、实践，或者类似的情况下需要注意，如果操作不当或未按要求使用，可能会导致产品被损毁，或丢失重要数据。在充分理解并满足指定条件之前，必须按照**注意事项**提示进行使用。

警告

警告 提示表示存在危险。提示在操作过程、实践，或者类似的情况下需要注意，如果操作不当或未按要求使用，可能会导致人身伤害或死亡。在充分理解并满足指定条件之前，必须按照**警告**提示进行使用。

摘要

介绍

实验背景 5

词汇表 9

试剂盒信息

试剂盒内容 11

试剂盒的运输和储存 11

额外所需的物品 12

实验流程

实验前一天 14

实验当天 14

运行实验 18

使用安捷伦 Seahorse 糖酵解速率测定报告生成器进行分析 19

常见问题



1 介绍

实验背景	5
词汇表	9

实验背景

与安捷伦 Seahorse XF96、XFe96 和 XFe24 分析仪配套使用。

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。与 Seahorse XFe24、XF96 或 XFe96 分析仪配套使用，Seahorse XF 糖酵解速率测定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（参见第 6 页上的图 1）。通过计算并减去线粒体 /TCA 循环来源的 CO₂ 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。

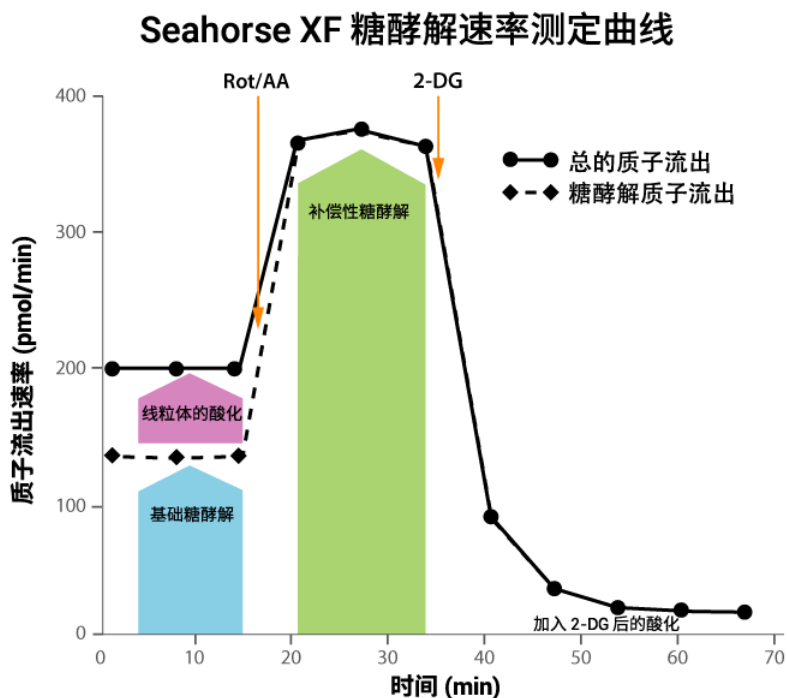


图 1 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定曲线。

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

Seahorse XF 分析仪直接实时测量细胞外酸化速率 (ECAR) 以及氧消耗速率 (OCR) — 两条主要的能量产生途径的指标：糖酵解和氧化磷酸化。大多数细胞都具有在这两条途径之间转换的能力，从而适应环境的变化。为了测定糖酵解速率，Seahorse XF 糖酵解速率测定实验利用 ECAR 和 OCR 的测量结果来确定细胞的糖酵解质子流出速率 (glycoPER)（定义如下）。

细胞中的葡萄糖转变为丙酮酸，然后在细胞质中转变为乳酸，或者在线粒体中转变为 CO_2 和水。葡萄糖转变为乳酸导致质子的净产生，并将质子排到细胞外溶液中（参见第 8 页上的图 2）。

细胞也可以利用细胞内或检测液中的葡萄糖和其他底物，通过线粒体呼吸产生能量。线粒体产生的 CO_2 可以在细胞外溶液中部分水合，从而在糖酵解之外产生额外的细胞外酸化。通过同时测量细胞的氧消耗量，能够计算线粒体/ CO_2 对细胞外酸化的贡献，并从总的质子流出速率 (PER) 中减去 CO_2 贡献的酸化。（详细解释请参见 *Agilent Seahorse XF CO_2 Contribution Factor Protocol User Guide*。）得到的结果，glycoPER，即是在糖酵解过程中排到细胞外溶液中的质子流出速率。该实验可实时测量糖酵解速率的变化，这可能是长期乳酸累积实验无法检测到的。

该实验流程如下：首先，细胞孵育在含有葡萄糖、谷氨酰胺、丙酮酸钠以及 HEPES 缓冲液的 Seahorse XF 糖酵解速率测定检测液中，记录三个测量循环的基础速率。随后，加入 Rot/AA（线粒体电子传递链抑制剂），以抑制线粒体氧消耗（并因此抑制 CO_2 来源的质子）。第二次打药加入 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG)，这是一种葡萄糖类似物，可通过竞争性结合糖酵解通路中的第一个酶葡萄糖己糖激酶抑制糖酵解。由此造成的 PER 降低提供了定性确认，证明加入 2-DG 前产生的 PER 主要来自于糖酵解。

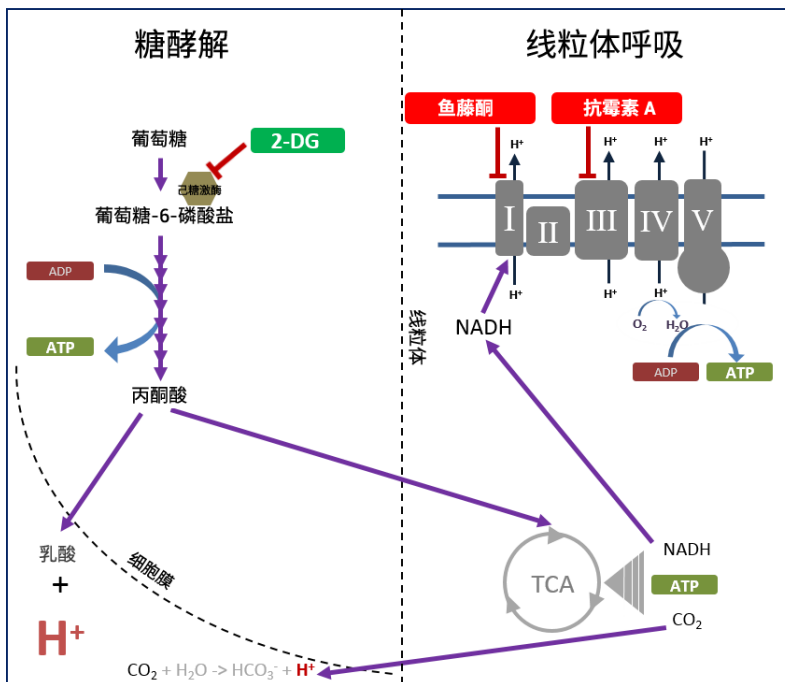


图 2 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定原理。
 细胞中的能量有两条产生途径：糖酵解和线粒体呼吸。在糖酵解途径中，葡萄糖分解为乳酸时，质子被排到细胞外培养基中，这可通过 XF 分析仪检测到，称为 ECAR。另外，线粒体 TCA 活动产生 CO₂，后者水合后使培养基酸化。在实验过程中，通过采用线粒体复合物 I 和复合物 III 抑制剂 (Rot/AA) 来抑制呼吸 (OCR)，可计算呼吸来源的质子流出速率，并将其从总的质子流出速率中减去，得到 glycoPER。为了证实通路特异性，加入糖酵解抑制剂 2-DG，抑制糖酵解酸化

词汇表

- **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, glycoPER):** 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



2 试剂盒信息

试剂盒内容	11
试剂盒的运输和储存	11
额外所需的物品	12

试剂盒内容

Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒包括 6 个铝箔袋，每个含有 Rot/AA 混合物和 2-DG。试剂盒中的试剂足够用于使用 96 孔或者 24 孔 Seahorse XF 细胞培养微孔板进行 6 次完整的 XF 糖酵解速率测定。

表 1 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒每个铝箔袋的内容

化合物	作用靶点	作用	盖子颜色	每管含量
鱼藤酮 + 抗霉素 A (Rot/AA)	分别为线粒体电子传递链复合物 I 和 III	抑制线粒体呼吸，通常会导致糖酵解增加	红色	各 27 nmol
2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG)	己糖激酶（糖酵解过程中的限速酶）	抑制己糖激酶，导致糖酵解降低	绿色	1500 μ mol

试剂盒的运输和储存

该产品室温运输，室温储存。该产品自生产之日起一年内稳定。实际的有效期印在试剂盒的标签上。根据发货日期的不同，用户手中的试剂盒实际保质期可能在 12 个月到 3 个月之间。

额外所需的物品

下面的物品试剂盒不提供，但是在运行 Seahorse XF 糖酵解速率测定时需要。

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		102342-100 或 102340-100
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/5991-7878ZH_CN_Agilent%20Seahorse%20XF%20Media%20Selection%20Guide.pdf

推荐用 p1000 移液器细长吸头来复溶所提供的管子中的化合物（例如，Fisherbrand SureOne Micropoint 移液器吸头，货号：02-707-402）。



3 实验流程

实验前一天 14

实验当天 14

运行实验 18

使用安捷伦 Seahorse 糖酵解速率测定报告生成器进行分析 19

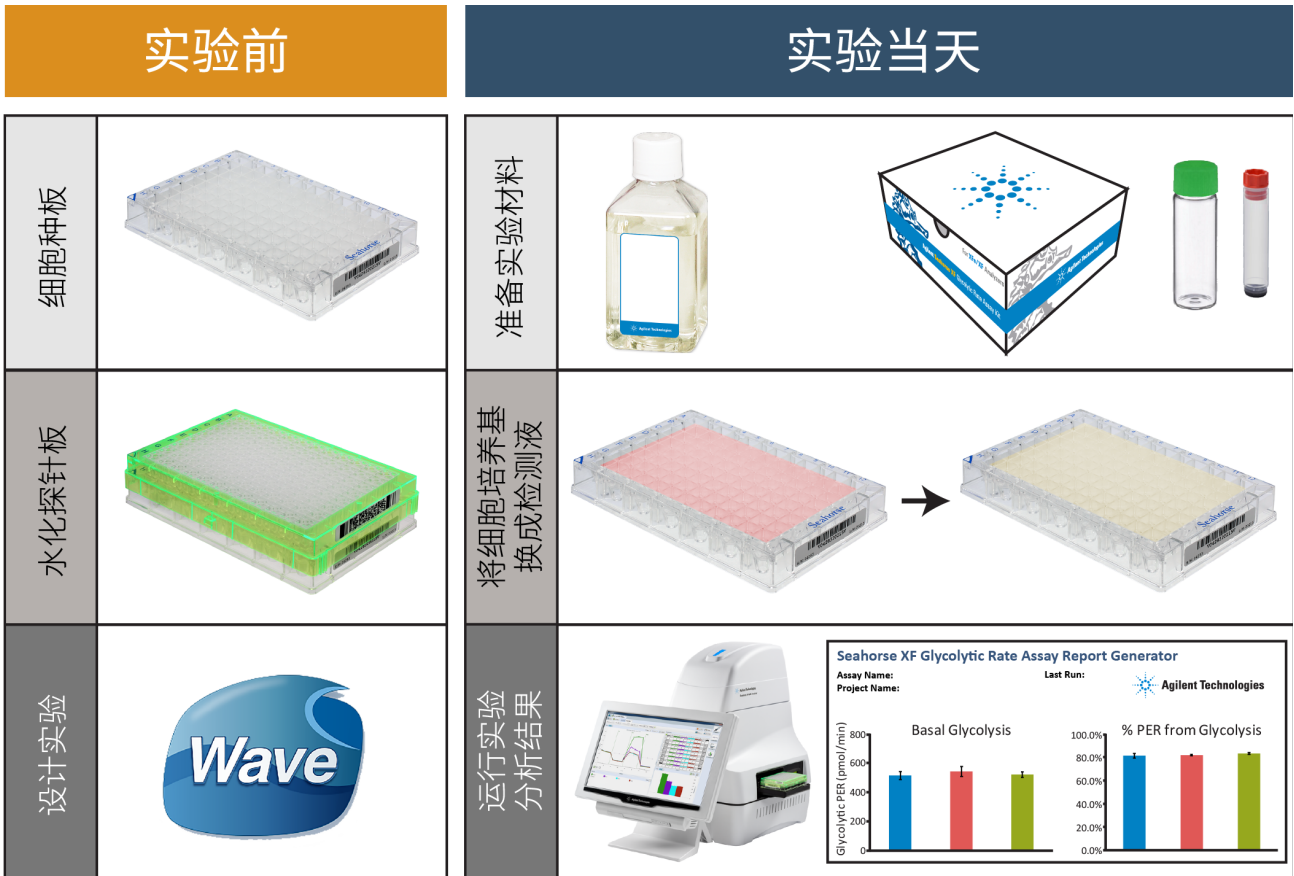


图 3 安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒实验流程

实验前一天

- 1 打开 Seahorse XFe/XF96 或 XFe24 分析仪，使温度达到稳定
- 2 对于贴壁细胞，在安捷伦 Seahorse XF 细胞培养微孔板中使用合适的细胞生长培养基、按照预定的细胞密度种板。更多信息，请参阅基本操作步骤，位于安捷伦细胞分析学习中心的“在 Seahorse XF 细胞培养微孔板中接种细胞”。

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay

注意

细胞系参考数据库是查找目标细胞类型信息的理想资源。请使用以下链接获得信息。

<http://www.agilent.com/cell-reference-database>

- 3 用 Seahorse XF 校准液水化一块传感器探针板，在 37 °C 无 CO₂ 的培养箱中水化过夜（参见基本操作步骤）
- 4 对于 XFe 分析仪，在 Wave 中选择 XF 糖酵解速率测定模板。根据具体的实验设计，对模板进行必要的分组修改。

实验当天

准备安捷伦 Seahorse 糖酵解速率测定检测液

- 1 补充添加剂到 Seahorse XF DMEM 或 RPMI 培养基，pH 7.4（货号 103575-100 和 103576-100）这些培养基含有合适量的 HEPES，无需添加额外的 HEPES。推荐添加 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。更多信息，请参阅基本操作步骤，位于安捷伦细胞分析学习中心的“配制用于 XF 实验的检测液”。

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay

注意

如果检测液与该配方存在显著差异，必须根据 Buffer Factor Protocol 推导出缓冲系数具体数值。详细信息参阅 [Agilent Seahorse XF Buffer Factor Protocol User Guide](#)。

- 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。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

准备安捷伦 Seahorse XF 细胞培养微孔板

贴壁细胞

- 1 从 37 °C CO₂ 培养箱中取出细胞培养微孔板，在显微镜下检查细胞，以确认铺板均匀以及细胞形态正常
- 2 洗细胞（更多细节请参见 XF 实验基本操作步骤）。从细胞培养微孔板中移除生长培养基。使用多通道移液器，用预热的检测液洗细胞一次，然后加入检测液，在 37 °C 无 CO₂ 的温箱中孵育 45–60 分钟
- 3 开始 XF 实验前，再一次移除检测液，加入新鲜的、预热的检测液（合适的初始体积，请参见第 17 页上的表 4）

悬浮细胞

- 1 离心收集生长培养基中的细胞，用预热的检测液重悬
- 2 细胞计数，制备细胞悬液，使其接种 50 μL (XF96/XFe96) 或 100 μL (XFe24) 细胞悬液到每个微孔时，含有所需的细胞数。4 个孔不接种细胞，作为背景校正孔
- 3 每孔接种所需细胞，低速离心使细胞附着在孔底
- 4 轻轻补加检测液到每个孔中。总体积需符合第 17 页上的表 4 中所示的合适的初始微孔体积的要求
- 5 实验前，将微孔板放置于 37 °C 无 CO₂ 的温箱中温育 45–60 分钟

配制化合物储备液

使用当天，复溶化合物。不要复冻。丢弃剩余的化合物。

- 1 从试剂盒中拿出一个铝箔袋，打开，拿出 Rot/AA（红色盖子）小管和 1 瓶 2-DG（绿色盖子）
- 2 打开前轻敲小管，确保粉末在管子的底部
- 3 如表 2 所示，使用 p1000 移液器吸取相应体积的检测液重悬每个组分。轻敲 Rot/AA，确保粉末在管子的底部。涡旋约 1 分钟，确保充分溶解

表 2 储备液

化合物	检测液体积	储备液浓度
Rot/AA	540 μL	50 $\mu\text{mol/L}$
2-DG	3000 μL	500 mmol/L

稀释化合物

表 3 描述了如何稀释化合物，以便加入探针板的加药孔中。请注意，如果使用不同的初始检测液体积或加药体积，调整化合物浓度，以便在细胞孔中获得推荐的终浓度。

表 3 配制化合物用于在 XF96、XFe96 或 XFe24 分析仪上运行 XF 糖酵解速率测定

加药孔 A Rot/AA	（细胞孔中 终浓度） ($\mu\text{mol/L}$)	储备液体积 (μL)	检测液体积 (μL)	10X (加药孔) ($\mu\text{mol/L}$)
	0.5	300	2700	5
加药孔 B 2-DG	（细胞孔中 终浓度） (mmol/L)	储备液体积 (μL)	检测液体积 (μL)	10X (加药孔) (mmol/L)
	50	3000	0	500

将化合物加入探针板上的加药孔中

标准实验 – 在加入糖酵解速率测定实验中的化合物前，不从加药孔加入其它化合物。将化合物加入已水化的探针板加药孔中：

- 加药孔 A: Rot/AA
- 加药孔 B: 2-DG

诱导实验 – 在加入糖酵解速率测定实验中的化合物之前，从加药孔加入所需测试的化合物，加药孔 A 用于加入待测化合物，按如下所示：

- 加药孔 A: 待测化合物（急性加药）或检测液对照
- 加药孔 B: Rot/AA
- 加药孔 C: 2-DG

表 4 列出使用 2 个或多个加药孔时，加入化合物的合适体积和浓度。

表 4 初始微孔检测液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	
	细胞孔初始体积： 180 μ L 检测液		细胞孔初始体积： 500 μ L 检测液	
加药孔	体积	浓度	体积	浓度
A	20 μ L	10X	56 μ L	10X
B	22 μ L	10X	62 μ L	10X
C	25 μ L	10X	69 μ L	10X
D	27 μ L	10X	76 μ L	10X

运行实验

将实验模板装载到 Seahorse XFe 分析仪上

如果已经有模板，跳过该步骤。

个人计算机（需联网）：

- 1 从安捷伦网站上下载 Seahorse XF 糖酵解速率测定报告生成器。下载文件包包括 XFe 糖酵解速率测定基础实验和诱导实验模板

注意

在注册下载报告生成器和相应的实验模板时，选择合适的 Seahorse XFe 分析仪（Seahorse XFe96 或 XFe24）。

- 2 转移到 USB 驱动器或网络驱动器中（如果 Seahorse XFe 分析仪已经联网）

Seahorse XFe96/XFe24 分析仪：

- 1 在 USB 接口前插入 USB 驱动器，等待 10 秒
- 2 单击 **Import**（New Assay 视图底部）
- 3 在 USB 或网络驱动器上找到实验模板
- 4 在 Windows 对话框中单击 **Open**
- 5 如需要，导入下一个模板
- 6 导入的实验模板可以在可用模板列表中进行选择

运行 Seahorse XF 糖酵解速率测定

- 1 从可用模板列表中选择 **Seahorse XF Glycolytic Rate Assay** 或 **Seahorse XF Glycolytic Rate Assay (Induced Assay)** 模板，并单击 **Design**（或双击该模板）
- 2 **Groups/Conditions**（组别/实验条件）：无需操作 — 确认或根据需要修改您的实验组别和条件。
- 3 **Plate Map**（板布局）：无需操作 — 确认或根据需要修改您的实验分组
- 4 **Instrument Protocol**（仪器运行方案）：无需操作 — 确认或根据需要修改仪器运行方案增加测量次数
- 5 **Review and Run**（检查和运行）：准备就绪时单击 **Start Run**
- 6 当出现提示时，将加过药的探针板和水化板放在 **Seahorse XFe** 分析仪上，然后单击 **I'm Ready**。校准大约需要 15–30 分钟

注意

移去探针板盖子，确认板的方向正确。

- 7 校准结束后，单击 **I'm Ready**，换上细胞培养微孔板
- 8 单击 **I'm Ready**，关闭托盘门，开始实验

使用安捷伦 Seahorse 糖酵解速率测定报告生成器进行分析

- 1 在 **Wave** 中，从已完成的运行结果中以 .xls 文件的格式导出数据
- 2 在 **XF 糖酵解速率测定报告生成器** 中加载数据文件，并选择要显示的组别
- 3 单击 **Update Summary**，获得 XF 糖酵解速率测定报告。详情请参阅 [Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Report Generator User Guide](#)

实验流程



4 常见问题解答

为什么要在检测液中添加缓冲液，它会抑制 ECAR 信号吗？

低浓度的 HEPES (5 mmol/L) 在实验过程中可提供稳定的缓冲能力。尽管这种低浓度的 HEPES 可能会轻微地降低原始的 ECAR 信号，但它显著地提高了 ECAR 信号的一致性以及转换为 PER 的准确性。

由 CO₂ 造成的检测液酸化会影响 ECAR 的测量吗？

由 TCA 循环产生的 CO₂ 对检测液的酸化可能会影响 ECAR，但其在不同细胞类型中的相对贡献差异很大。通过测量加入 Rot/AA 前后的 OCR，使用缓冲系数 (Buffer Factor, BF) 以及二氧化碳贡献系数 (CO₂ contribution factor, CCF) 计算线粒体 PER，从总的 PER 中减去后可得到 glycoPER。Seahorse XF 糖酵解速率测定能够报告糖酵解产生酸化的百分比，可简便地指示是否有大量的酸来自于 CO₂。

如何用线粒体氧消耗速率计算线粒体酸化？

线粒体氧消耗速率 (mitoOCR) 和源自线粒体的酸化 (mitoPER) 之间存在线性关系，即二氧化碳贡献系数 (CCF)，mitoPER/mitoOCR 比率，在大多数类型的细胞中是一个常数。在糖酵解速率测定完成后，使用 Seahorse XF 糖酵解速率测定报告生成器分析时，采用预定的 CCF，通过 mitoOCR 计算线粒体对酸化的贡献。然而，对于高氧化代谢的细胞（来自糖酵解的 PER 百分比 < 50%），建议根据 *Seahorse XF CO₂ Contribution Factor Protocol User Guide* 重新确认具体细胞类型的 CCF。关于计算和常量推导的更多细节，请参见安捷伦白皮书 *Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Seahorse XF Technology* <http://seahorseinfo.agilent.com/acton/fs/blocks/showLandingPage/a/10967/p/p-00ca/t/page/fm/1>。



该实验提供了哪些基础 ECAR 不能获得的信息？

在大多数情况下，基础 ECAR 是糖酵解的一个很好的定性指标，然而，它包括来自所有酸源引起的酸化，并且未考虑检测液的缓冲能力。Seahorse XF 糖酵解速率测定通过减去线粒体来源的酸化，可更精确地测量糖酵解产生的细胞外酸化，同时，以标准单位 (pmol/min) 报告数据。这些特性使 Seahorse XF 糖酵解速率测定与细胞外乳酸产量测定具有高度的可比性。

需要自己计算缓冲液系数 (BF) 吗？

如果使用的是推荐的检测液，则不需要。如上所述，对于标准的 XF Seahorse 糖酵解速率测定检测液，缓冲液系数已确定。当使用含有某种替代成分（不同的基础培养基或底物浓度）的检测液时，应根据 *Seahorse XF Buffer Factor Protocol* 确定缓冲系数。

必须使用不含酚红的检测液吗？为什么？

酚红干扰 pH 传感器，导致 pH 测量值低于检测液的实际 pH 值。虽然这并不影响原始的 ECAR 值，但是为了准确计算 PER 和 glycoPER，检测液必须不含酚红。

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

© 安捷伦科技（中国）有限公司

2019年5月，中国出版
修订版 E0

仅限研究使用。
不可用于诊断目的。



103344-400