

安捷伦 XF 底物氧化压力测试试剂盒

用户手册

XF 长链脂肪酸氧化压力测试试剂盒	(103672-100)
XF 葡萄糖/丙酮酸氧化压力测试试剂盒	(103673-100)
XF 谷氨酰胺氧化压力测试试剂盒	(103674-100)
XF 棕榈酸氧化压力测试试剂盒	(103693-100)

注意

© 安捷伦科技公司 2020

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

5994-1164ZHCN

修订版 A0

版本

第一版，2020年1月

美国出版

安捷伦科技公司

1834 Hwy 71 West

Cedar Creek, TX 78612

Product is made in UK.

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	前言	
	实验背景	6
	XF 底物氧化压力测试 – 标准实验	8
	XF 棕榈酸氧化压力测试 – 进阶实验	12
	术语表	16
	参考文献	18
2	试剂盒信息	
	试剂盒内容物	20
	试剂盒的运输和储存	21
	所需的其他安捷伦产品	21
3	标准底物氧化压力测试实验流程	
	实验前一天	24
	实验当天	24
	使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析	30
	数据示例	32
4	棕榈酸氧化压力测试实验流程 – 进阶实验	
	实验前两天	36
	实验前一天	36
	实验当天	37
	使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析	42
	数据示例	44
5	常见问题解答	
6	其他 XF 试剂盒和应用中底物氧化测试的背景	

1

前言

实验背景	6
XF 底物氧化压力测试 – 标准实验	8
XF 棕榈酸氧化压力测试 – 进阶实验	12
术语表	16
参考文献	18

实验背景

安捷伦 Seahorse XF 技术可以实时测定活细胞的能量代谢，提供与细胞活力和适应性直接相关的关键功能信息。Seahorse XF 底物氧化压力测试可以提供关键指标，有助于评估与细胞表型和功能相关的或细胞表型和功能所需的特定线粒体底物。

安捷伦提供了一套优化的快速分析方法，通过评估活细胞中耗氧率 (OCR) 的变化来测定细胞底物氧化。XF 底物氧化压力测试试剂盒既可以灵敏测量线粒体功能，也可以分析 3 种主要的线粒体底物：长链脂肪酸 (LCFAs)、葡萄糖/丙酮酸 (G/P) 和/或谷氨酰胺 (Q) (图 1)。使用这些试剂盒能够更方便地研究特定的底物氧化过程，以及它们在激活、增殖和分化等基本细胞功能中的重要作用，此外还能更好地表征对基因操作、药物干预或特定疾病相关微环境的响应。

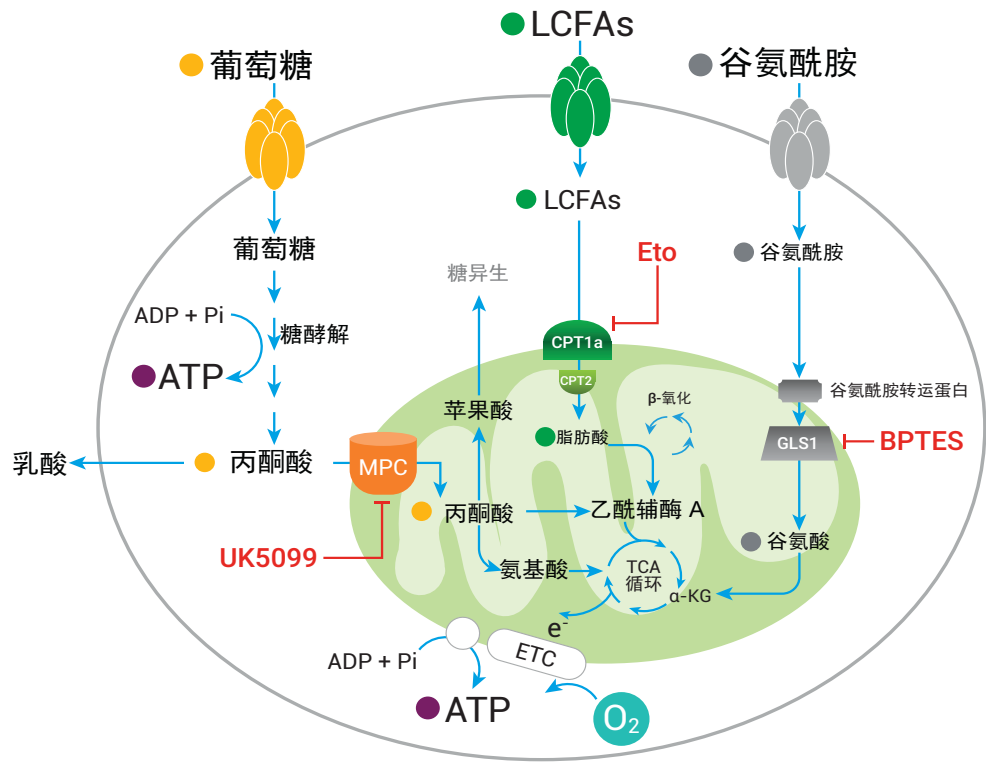


图 1. 主要的代谢通路，包括糖酵解、TCA 循环、电子传递链 (ETC) 和氧化磷酸化 (OXPHOS)。突出显示了葡萄糖/丙酮酸、谷氨酰胺和长链脂肪酸氧化。红线表示葡萄糖/丙酮酸、LCFA 和谷氨酰胺转运的相关抑制剂，这些抑制剂继而特异性限制了相应底物的氧化

XF 底物氧化压力测试结合了底物通路特异性抑制剂 (图 1: Etomoxir 通过抑制肉毒碱棕榈酰基转移酶 1a (CPT1a) 来抑制 LCFAs 的氧化¹; UK5099 通过抑制线粒体丙酮酸载体蛋白 (MPC) 来抑制葡萄糖和/或丙酮酸的氧化²; 以及 BPTES 通过抑制谷氨酰胺酶 1 (GLS-1) 来抑制谷氨酰胺的氧化³) 和 XF 细胞线粒体压力测试 (MST)。MST 是一种公认的用于研究线粒体功能的强大工具，与这些抑制剂结合使用，可以揭示对特定代谢底物的依赖性。基础呼吸速率和最大呼吸速率是 MST 报告线粒体功能的关键指标。在底物氧化背景下，基础呼吸速率，尤其是最大呼吸速率在很大程度上受到细胞对可用底物的运输能力和氧化能力的影响⁴。无论是在基础条件下还是在更高的底物需求 (最大呼吸) 做出响应时，该方法都非常适合于评估细胞底物需求。图 2 概述了标准底物氧化分析和相关分析参数的动力学曲线。

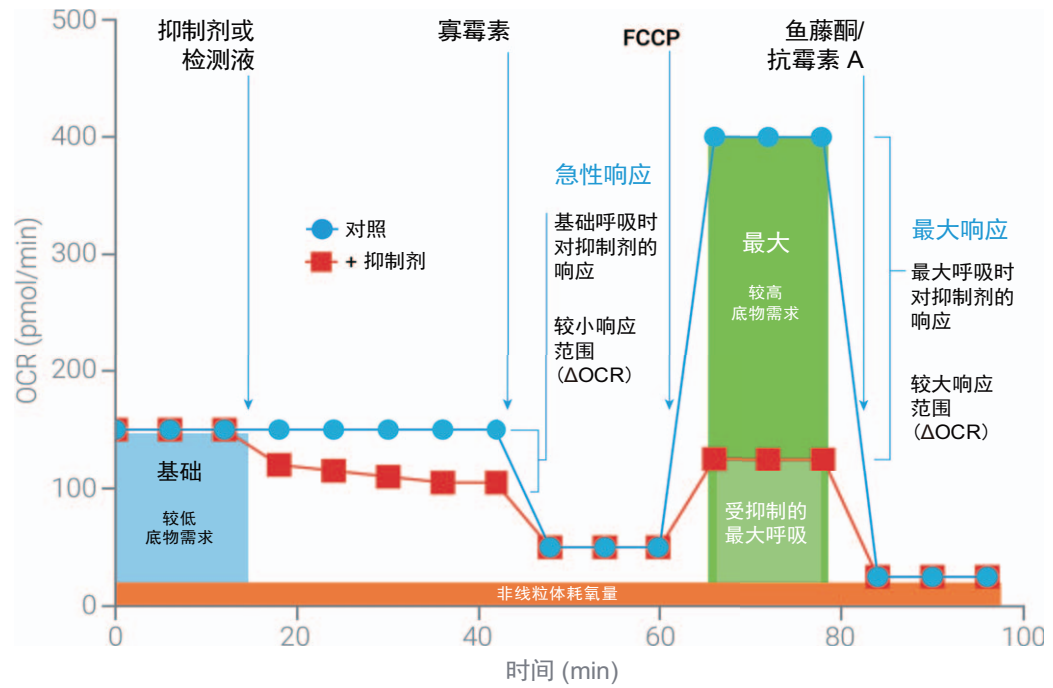


图 2. 安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试曲线中对底物需求至关重要的呼吸参数。存在或不存在抑制剂时，连续添加化合物，测定基础呼吸、对抑制剂（Etomoxir、UK5099 或 BPTES）的急性响应以及最大呼吸。值得注意的是，虽然在基础条件下可以检测到较小的变化，即急性响应，但在高底物需求条件下（如 FCCP），往往会出现更大的响应，从而显示出细胞氧化所研究底物能力的差异

通过测试可以获得丰富的信息，因为所描述的设计可以提供基础呼吸数据以及基础底物需求条件下通路抑制的影响，同时还能表征通路抑制对最大呼吸的影响，反映在较高的底物需求下，细胞对特定代谢通路损伤的敏感性。由于许多类型的细胞都具有代谢可塑性，在高需求条件下，评估底物依赖性通常可以获得更丰富的信息，因为这可以揭示细胞的底物利用能力。当线粒体氧化磷酸化发生解偶联（如暴露于 FCCP）时，底物氧化增加，以产生更高的呼吸速率所需的还原当量。通过比较对照细胞和被抑制细胞的最大呼吸速率，可以研究细胞在满足这种高能量需求时对特定底物的依赖程度。

本手册详细说明了如何使用 XF 底物氧化压力测试套装来开展所有分析。一般来说，有两种不同的分析类型：标准实验和进阶实验。XF LCFA 氧化压力测试试剂盒、XF 谷氨酰胺氧化压力测试试剂盒和葡萄糖/丙酮酸氧化压力测试试剂盒使用标准实验流程，在存在多个底物的情况下使用单一抑制剂进行分析。相反，XF 棕榈酸氧化压力测试试剂盒需要使用进阶实验方案，因为涉及额外的步骤（图 5、图 6 和图 10），并且实验中使用棕榈酸作为长链脂肪酸底物，Etomoxir 作为抑制剂。以下是这些实验的原理和设计。

XF 底物氧化压力测试 – 标准实验

相关试剂盒包括：

XF 长链脂肪酸氧化压力测试试剂盒 (货号 103672-100)

XF 葡萄糖/丙酮酸氧化压力测试试剂盒 (货号 103673-100)

XF 谷氨酰胺氧化压力测试试剂盒 (货号 103674-100)

为了进行标准底物氧化压力测试，首先确定基础呼吸参数，然后添加相应的通路抑制剂。通过多个测量循环（通常为 6 个）监测对抑制剂的急性响应。然后，依次添加标准 XF 细胞线粒体压力测试试剂，如寡霉素、FCCP 和鱼藤酮/抗霉素 A，与 XF 细胞线粒体压力测试所用的实验方案相似。图 3 概述了每种试剂盒的实验流程。

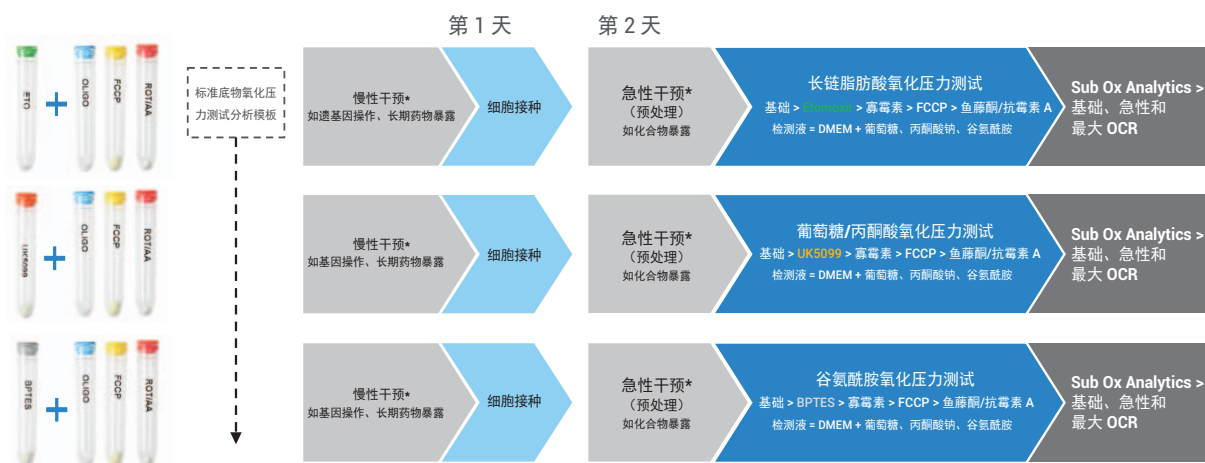


图 3. 安捷伦 XF 底物氧化压力测试 – 标准实验设计。每种试剂盒使用相关抑制剂测试一种底物。在分析之前采取慢性或急性干预措施（基因操作/药物暴露），以了解这些调控对特定线粒体底物氧化的影响

每种试剂盒都使用相关抑制剂在优化浓度下测试单一底物：Etomoxir (4 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 LCFAs 的氧化，UK5099 (2 $\mu\text{mol/L}$) 抑制葡萄糖和/或丙酮酸的氧化，BPTES (3 $\mu\text{mol/L}$) 抑制谷氨酰胺的氧化（最终浓度）。这三组实验均在检测液中的葡萄糖 (10 mmol/L)、丙酮酸钠 (1 mmol/L) 和谷氨酰胺 (2 mmol/L) 底物饱和的条件下进行。长链脂肪酸来源于细胞内源性脂质/LCFAs，因此与细胞类型有关。图 3 表明，除了所用的抑制剂不同以外，每种 XF 底物氧化压力测试的标准方法和分析条件均相同。

注意

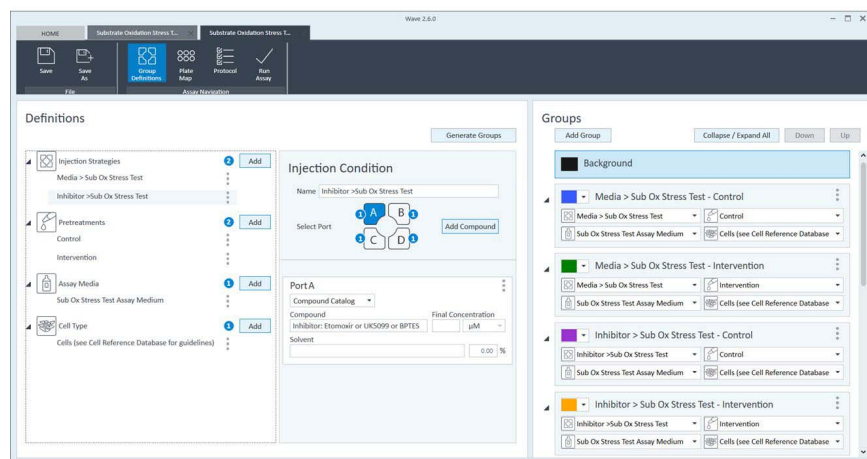
用户必须首先确定最佳细胞接种密度和最佳 FCCP 浓度，以获得理想的分析性能和结果数据。通常，这些条件与 XF 细胞线粒体压力测试中相应细胞类型所用的条件相同。有关如何优化细胞接种密度和 FCCP 浓度的信息，请访问安捷伦细胞分析学习中心网站。

在这些标准分析中，对抑制剂产生响应（即呼吸速率降低）表明，在所建立的实验条件下，细胞对特定的底物有需求或具有偏好性。一般来说，这些分析有助于推动研究，并解决以下问题：

- 细胞对特定的底物有需求吗？
- 细胞是高度依赖于特定的底物，还是其他底物也能满足细胞的需求？
- 如果对细胞实施基因操作或药物暴露等干预措施，线粒体底物需求和/或依赖性将受到何种影响？

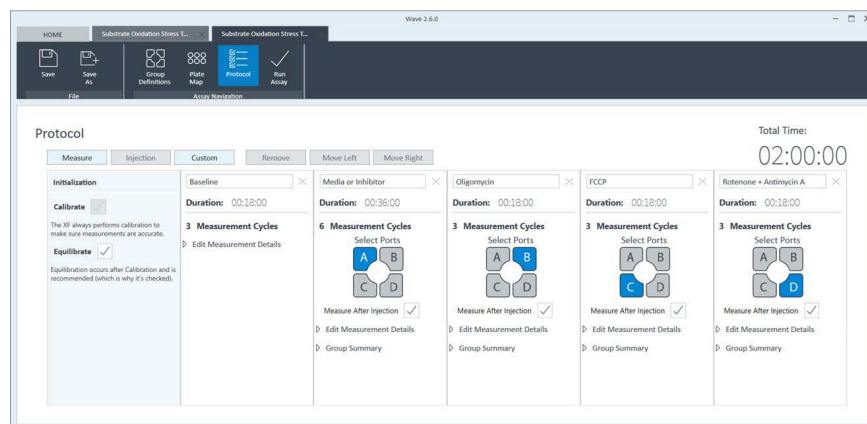
与大多数 XF 实验一样，通常是在研究人员设计的预处理或干预措施后进行底物氧化压力测试。这可能是在 XF 分析前几小时至几天对细胞采取慢性干预措施（如基因操作或长期药物暴露），也可能是采取急性干预措施（如药物暴露）后立即进行 XF 分析（图 3）。在某些情况下，可以同时采取慢性和急性干预措施（例如，通过化合物暴露来拯救基因功能障碍）。这些试剂盒可单独使用（即针对一种特定底物），用于研究一系列干预措施或化合物如何影响特定底物的氧化；或联合使用（即侧重于两种或两种以上的底物）以阐明一项给定的干预措施对底物氧化和线粒体功能的整体影响。

有关 XF 底物氧化压力测试 – 标准实验的分析模板设计示例，请参阅图 4。



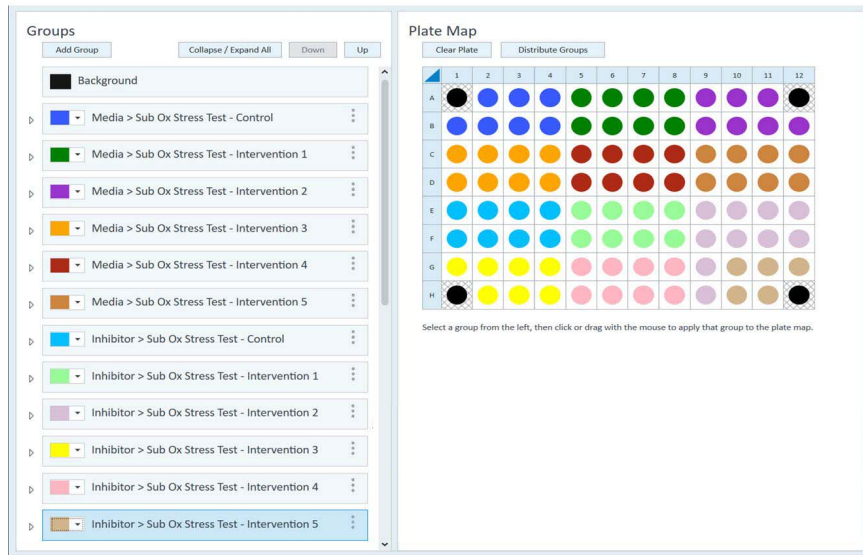
4A.

Starting group definitions for the Standard Substrate Oxidation Stress Test Assay Template. Here, the user must decide on the type of intervention(s) and the inhibitor identify used.



4B.

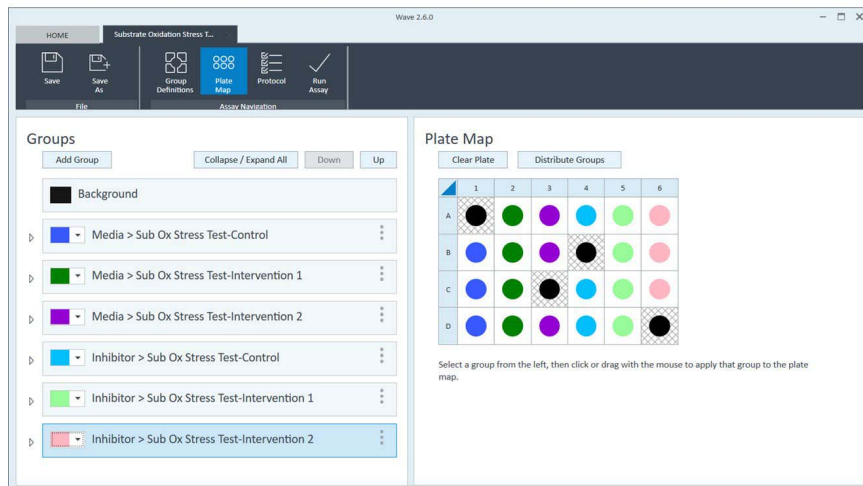
Instrument protocol for XF/XFe96 analyzers. For XF/XFe24 analyzers, include the default 2-minute wait step required for 24-well XF platforms.



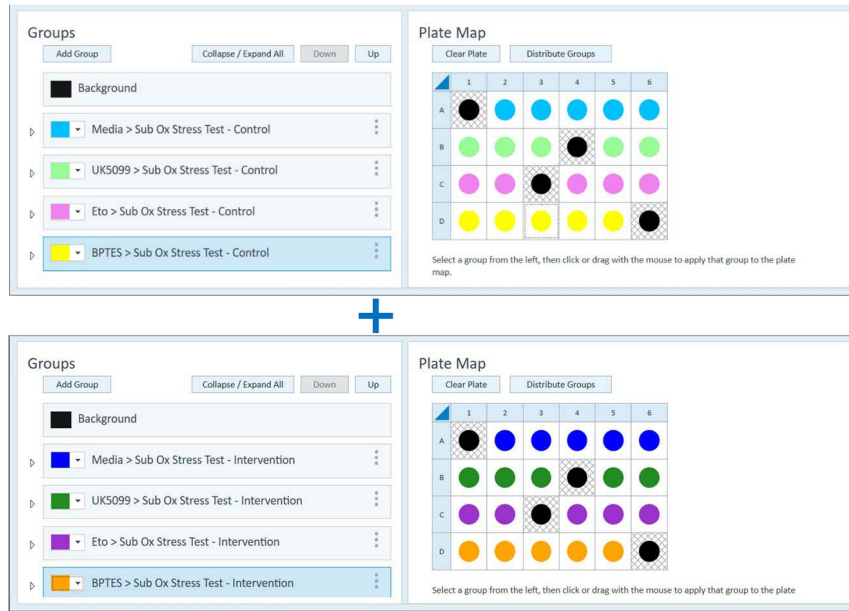
4C.
 XFe96/XF96 plate map layout for testing the effects of multiple interventions (genetic variants and/or drug exposures) on the oxidation of a specific substrate (LCFAs or G/P or Q).



4D.
 XFe96/XF96 plate map layout for testing the effects of a single intervention (genetic variant or drug exposure) on the oxidation of each substrate LCFAs and G/P and Q.



4E.
 XFe24/XF24 plate map layout for testing the effects of multiple interventions (genetic variants and/or drug exposures) on the oxidation of a specific substrate (LCFAs or G/P or Q).



4F. XFe24/XF24 plate map layout for testing the effects of a single intervention (genetic variant or drug treatment) on the oxidation of each substrate LCFA and G/P and Q (Attention: 2 plates are required).

图 4. 安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试 – 实验设计示例。这些示例仅为建议的设计，用户可以修改通用的标准底物氧化压力测试分析模板文件，以适应实验设计的具体要求

XF 棕榈酸氧化压力测试 – 进阶实验

相关试剂盒包括：

XF 棕榈酸氧化压力测试试剂盒（货号 103693-100）

XF 棕榈酸氧化压力测试进阶实验详细说明了特异性分析活细胞中长链脂肪酸氧化通路的工作流程。试剂盒中包括 XF 棕榈酸-BSA FAO 底物、左旋肉碱、Etomoxir 以及寡霉素、FCCP 和鱼藤酮/抗霉素 A，用于确定在其他外源性底物缺乏或有限的情况下，细胞氧化棕榈酸的特性速率和能力。本工作流程尤其适用于研究干预措施（基因操作和药物暴露）对 LCFA 氧化过程的特异性影响，可作为前一章节讨论的 XF 长链脂肪酸氧化压力测试标准实验流程的补充和/或后续分析。进阶棕榈酸氧化实验的动力学曲线和相关分析参数如图 5 所示，进阶实验的实验流程如图 6 所示。

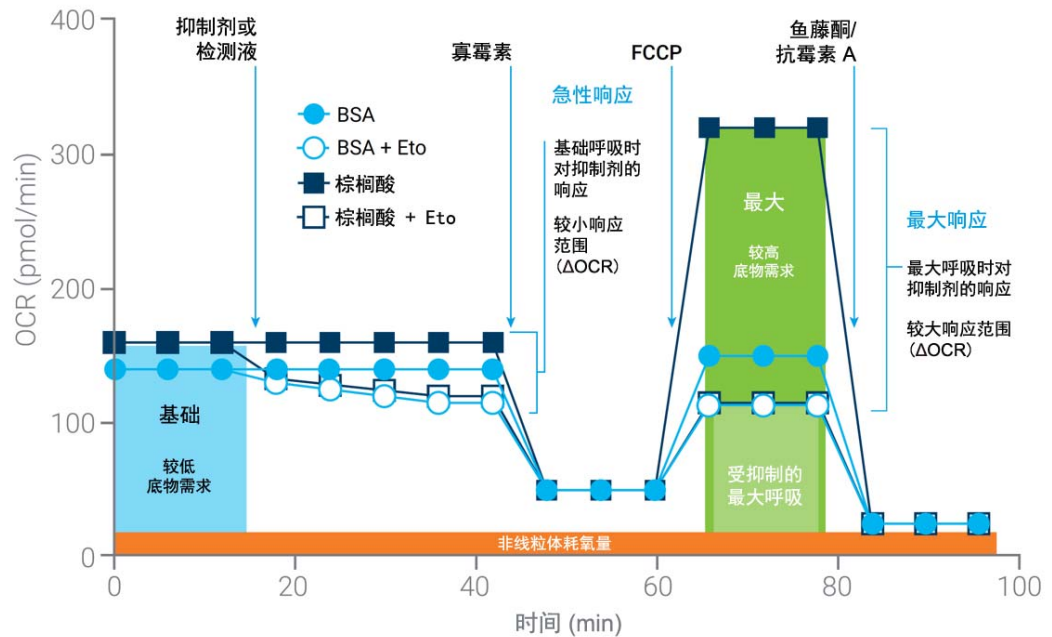


图 5. 安捷伦 Seahorse XF 棕榈酸氧化压力测试曲线中对棕榈酸需求至关重要的呼吸参数。存在或不存在 Etomoxir 时，连续添加化合物，测定基础呼吸、对 Etomoxir 的急性响应以及最大呼吸。值得注意的是，虽然在基础条件下可以检测到较小的变化，即急性响应，但在高底物需求条件下（如 FCCP），往往会出现更大的响应，从而显示出细胞氧化棕榈酸能力的差异



图 6. 安捷伦 XF 棕榈酸氧化压力测试 – 进阶实验。本实验旨在使用抑制剂 Etomoxir 抑制棕榈酸的氧化，以确定在其他外源性底物缺乏或有限的情况下，细胞氧化棕榈酸的特性速率和能力

棕榈酸氧化压力测试在检测液中棕榈酸（棕榈酸-BSA 的形式）和左旋肉碱饱和，而葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺底物供应有限的条件下进行。当实验设计要求细胞仅氧化长链脂肪酸（如棕榈酸）以研究干预措施对长链脂肪酸氧化过程的特异性影响时，本测试尤其适用。

如图 6 所示，该工作流程通常要求在分析之前和/或分析期间限制底物，以调节细胞对添加到检测液中的棕榈酸底物的稳定响应。建议的初始底物限制生长培养基条件见表 1。

注意

用户必须首先确定最佳细胞密度和最佳 FCCP 浓度，以获得最佳分析性能和结果数据。通常，这些条件与 XF 细胞线粒体压力测试中相应细胞类型所用的条件相同，只是在 BSA 存在下 FCCP 浓度可能需要重新优化。有关如何优化细胞密度和 FCCP 浓度的信息，请访问安捷伦细胞分析学习中心网站。

表 1 用基础生长培养基进行 XF 棕榈酸氧化压力测试进阶实验时建议的底物限制条件。在底物限制下的初始建议培养时间为过夜（16 至 24 小时）。

基础生长培养基	生长培养基补充剂	底物限制生长培养基的建议初始浓度
DMEM 或 RPMI 不含葡萄糖、丙酮酸钠、谷氨酰胺或 GlutaMAX	葡萄糖	0.5 mmol/L
	谷氨酰胺或 GlutaMAX	1.0 mmol/L
	血清（如 FBS）	1%
	Seahorse 左旋肉碱	0.5 mmol/L

表 2 用 XF 检测液进行 XF 棕榈酸氧化压力测试进阶实验时建议的底物限制条件。

XF 检测液	检测液补充剂	检测液的建议初始浓度
XF DMEM 培养基, pH 7.4 或 XF RPMI 培养基, pH 7.4	XF 葡萄糖	2.0 mmol/L
	XF 左旋肉碱	0.5 mmol/L
XF 棕榈酸-BSA*	96 孔	30 μL/ 孔
		85 μL/ 孔
	24 孔	30 μL/ 孔
		85 μL/ 孔
XF BSA 对照*	96 孔	30 μL/ 孔
	24 孔	85 μL/ 孔

* 注意，即将开始实验之前，将 XF 棕榈酸-BSA 和 XF BSA 对照直接添加到 XF 细胞培养板孔中。更多信息见第 37 - 38 页。

注意

最佳限制底物浓度和最佳孵育时间取决于细胞，应根据目标细胞类型进行经验判断。

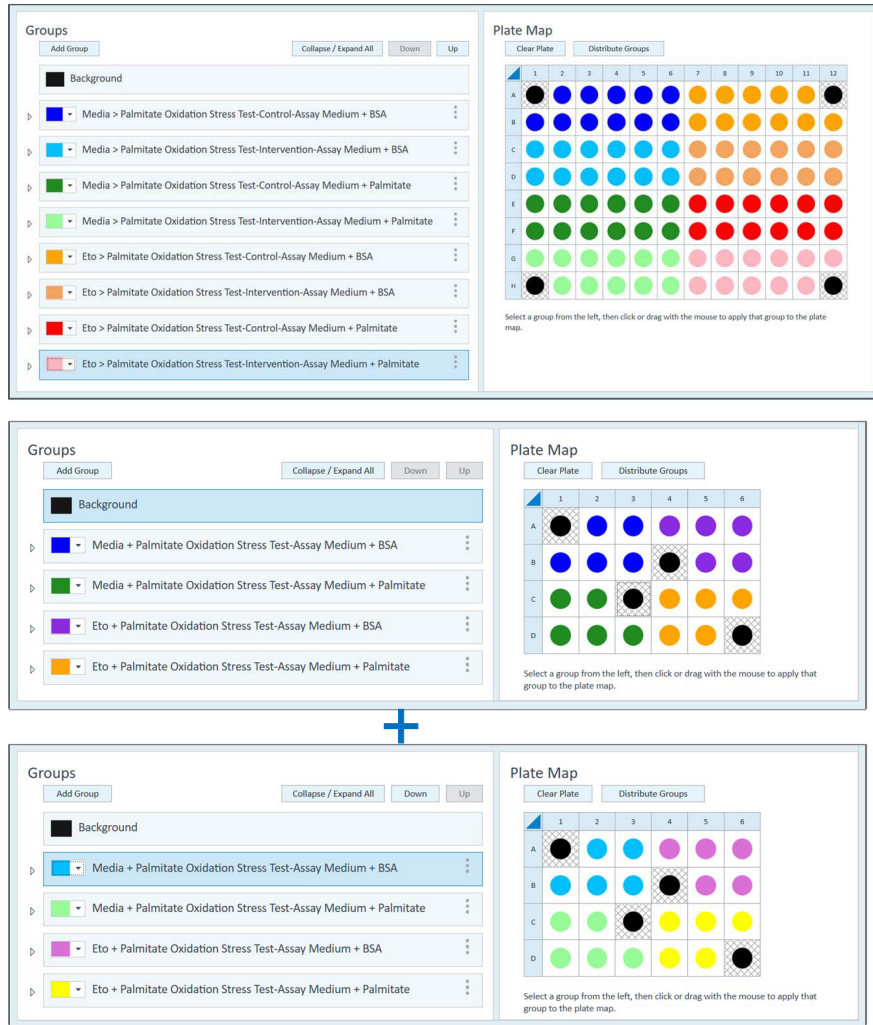
这种进阶实验不是研究底物的需求和依赖性，而是回答以下类型的问题：

- 当对细胞施加某种干预措施（如基因操作或药物暴露）时，其如何特异性地影响长链脂肪酸的氧化？

这种分析通常是在研究人员设计的一些预处理条件或干预下进行的。这可能是在 XF 分析前几小时至几天对细胞采取慢性干预措施（如基因操作或长期药物暴露），也可能是采取急性干预措施（如药物暴露）后立即进行 XF 分析（图 6）。在某些情况下，可以同时采取慢性和急性干预措施（例如，通过化合物处理来拯救基因功能障碍）。有关 XF 棕榈酸氧化压力测试 – 进阶实验的分析模板设计示例，请参阅图 7。

这一进阶实验流程与前一章节中的标准实验流程之间有着重要而明显的区别，包括：

- 通常需要对细胞进行一段时间的底物限制来测量提供的棕榈酸底物的氧化，特别是已建立的细胞系。具体条件因细胞类型而异，并且应根据每种被测细胞类型进行经验判断，特别是原代细胞
- 每种测试条件必须包括一个 BSA 对照组，以确保观察到的反应与检测液中的棕榈酸-BSA 相关。因此，设计的组数是标准底物氧化压力测试的两倍。有关棕榈酸氧化压力测试分析模板的示例，请参阅图 6
- 底物限制培养基和检测液中包含左旋肉碱，以确保它不是分析的速率限制因子
- 底物限制条件和进阶实验的性能仅针对 XF 棕榈酸-BSA 底物和 BSA 对照进行了验证



7A.
XFe96/XF96 plate map layout for testing the effects of a single intervention (genetic variant or drug exposure) specifically on the oxidation of palmitate by the cell.

7B.
XFe24/XF24 plate map layouts for testing the effects of a single intervention (genetic variant or drug exposure) specifically on the oxidation of palmitate by the cell. Attention: 2 plates are required.

图 7. 安捷伦 XF 棕榈酸氧化压力测试 — 孔板布局示例

术语表

- **基础呼吸**: 用于满足细胞 ATP 需求的耗氧量和线粒体质子渗漏所致的耗氧量。显示基础条件下细胞的底物需求
- **急性响应**: 由于加入底物氧化抑制剂 (Etomoxir、UK5099、BPTES) 而引起的耗氧率变化。报告为 OCR 变化 (即 ΔOCR pmol/min)
- **最大呼吸**: 加入解偶联剂 FCCP 获得的最大耗氧率。FCCP 通过刺激呼吸链在最大能力下工作来增加对底物的需求, 这会导致底物 (糖、脂肪和氨基酸) 的快速氧化来应对这一代谢挑战。显示细胞在最大呼吸条件下的底物需求
- **非线粒体呼吸**: 在添加鱼藤酮/抗霉素 A 后, 由于一些细胞酶继续消耗氧气而持续产生氧消耗。这对于准确测量线粒体呼吸非常重要
- **标准底物氧化压力测试工作流程**: 3 种互补性分析, 每种分析都侧重于使用相关抑制剂 (Etomoxir 或 UK5099 或 BPTES) 在优化浓度下测试细胞对单个底物 (LCFAs、G/P 或 Q) 的需求。在检测液中的葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺底物饱和的条件下进行分析 (图 2、图 3、图 4 和图 8)
- **进阶 XF 棕榈酸氧化压力测试**: 单一分析, 旨在确定在其他外源性底物缺乏或有限的情况下, 细胞氧化棕榈酸的特性速率和能力。在检测液中棕榈酸 (棕榈酸-BSA 的形式) 和左旋肉碱饱和的条件下进行分析。当实验设计要求细胞仅氧化长链脂肪酸 (如棕榈酸) 以研究干预措施对长链脂肪酸氧化过程的特异性影响时, 本测试尤其适用 (图 5、图 6、图 7、图 12 和表 1)
- **MST**: XF 细胞线粒体压力测试是一种广受认可的分析方法, 通过报告线粒体呼吸的多个参数, 全面了解线粒体功能。如需了解更多信息, 请访问 [安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试](#) 产品网站
- **FAO**: 脂肪酸氧化
- **Etomoxir**: 一种长链脂肪酸氧化抑制剂。Etomoxir 抑制肉毒碱棕榈酰基转移酶 1a (CPT1a), 该酶对于长链脂肪酸从细胞质基质转移至线粒体进行 β 氧化至关重要。注意, 浓度超过 $4\ \mu\text{mol/L}$ (终浓度) 会对线粒体呼吸产生严重的脱靶效应
- **UK5099**: 一种葡萄糖氧化通路抑制剂。UK5099 抑制线粒体丙酮酸载体蛋白 (MPC), 该蛋白可以将丙酮酸转运到线粒体中。细胞通过糖酵解将葡萄糖转化为丙酮酸。丙酮酸可以转运到线粒体中, 并通过 TCA 循环氧化
- **BPTES**: 一种谷氨酰胺氧化通路抑制剂。BPTES 是谷氨酰胺酶 (GLS1) 的变构抑制剂。谷氨酰胺酶将谷氨酰胺转化为谷氨酸, 然后谷氨酸转化为 α -酮戊二酸, 并通过 TCA 循环氧化。注意, BPTES 不抑制 GLS2
- **LCFAs**: 长链脂肪酸
- **G/P**: 葡萄糖/丙酮酸
- **Q**: 谷氨酰胺

- **左旋肉碱：**棕榈酸氧化压力试剂盒中提供的一种补充剂，用于底物限制生长培养基和底物限制检测液。确保左旋肉碱的浓度饱和，不限制棕榈酸的氧化速率
- **生长培养基：**适合特定细胞类型的补充剂充分的细胞培养基
- **底物限制：**棕榈酸氧化压力测试 — 进阶实验中使用的条件。它通常是指在一段时间内（例如，过夜），降低细胞培养基中关键底物（通常是葡萄糖、丙酮酸钠、GlutaMAX 和血清）的浓度
- **底物限制生长培养基：**关键底物（通常是葡萄糖、丙酮酸钠、GlutaMAX 和血清）浓度降低的细胞培养基（见表 1）
- **底物限制检测液：**关键底物（通常是葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺）浓度降低和/或不含这些关键底物的检测液（见表 2）

参考文献

- 1 Divakaruni, A. S.; *et al.* **2018**. 'Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis', *Cell Metab*, 28: 490-503.e7
- 2 Divakaruni, A. S.; *et al.* **2014**. 'Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data', *Methods Enzymol*, 547: 309-54
- 3 Hildyard, J. C.; *et al.* **2005**. 'Identification and characterisation of a new class of highly specific and potent inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier', *Biochim Biophys Acta*, 1707: 221-30
- 4 Robinson, Mary M.; *et al.* **2007**. 'Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES)', *Biochemical Journal*, 406: 407-14

2

试剂盒信息

试剂盒内容物	20
试剂盒的运输和储存	21
所需的其他安捷伦产品	21

试剂盒内容物

Seahorse XF 底物氧化压力测试的相关产品包括 4 种试剂盒。每种试剂盒包含的试剂足以在 96 或 24 孔安捷伦 Seahorse XF 细胞培养微孔板中进行 3 次完整的 XF 底物氧化压力测试。每种试剂盒的内容物或组分不同，具体取决于所测试的底物，如表 3 所示。

表 3 安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试试剂盒中每一袋包含的内容物，每个试剂盒共有三 (3) 袋或小瓶（棕榈酸和 BSA 对照）

化合物	瓶盖颜色	每瓶数量
安捷伦 Seahorse XF 长链脂肪酸氧化压力测试试剂盒内容物（货号 103672-100）		
Etomoxir	绿色	112 nmol
寡霉素	蓝色	63 nmol
FCCP	黄色	72 nmol
鱼藤酮/抗霉素 A	红色	各 27 nmol
安捷伦 Seahorse XF 葡萄糖/丙酮酸氧化压力测试试剂盒内容物（货号 103673-100）		
UK5009	橙色	84 nmol
寡霉素	蓝色	63 nmol
FCCP	黄色	72 nmol
鱼藤酮/抗霉素 A	红色	各 27 nmol
安捷伦 Seahorse XF 谷氨酰胺氧化压力测试试剂盒内容物（货号 103674-100）		
BPTES	灰色	56 nmol
寡霉素	蓝色	63 nmol
FCCP	黄色	72 nmol
鱼藤酮/抗霉素 A	红色	各 27 nmol
安捷伦 Seahorse XF 棕榈酸氧化压力测试试剂盒内容物（货号 103693-100）		
Etomoxir	绿色	112 nmol
寡霉素	蓝色	63 nmol
FCCP	黄色	72 nmol
鱼藤酮/抗霉素 A	红色	各 27 nmol
XF 棕榈酸-BSA	-	2 mL
XF BSA 对照	-	2 mL
Seahorse 左旋肉碱	棕色	10 mg

试剂盒的运输和储存

产品于环境温度下运输，并可在室温下储存，XF 棕榈酸-BSA FAO 底物除外。XF 棕榈酸-BSA FAO 底物采用冰袋运输，收货后应立即置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。所有试剂盒自生产之日起可稳定储存 1 年，XF 左旋肉碱自生产之日起可稳定储存 2 年。试剂盒有效期印于试剂盒标签上。根据发货日期的不同，用户手中试剂盒的实际保质期可能在 3 至 12 个月不等。

所需的其他安捷伦产品

进行 Seahorse XF 底物氧化压力测试还需要以下产品，这些产品不随试剂盒提供。有关 XF 分析所需材料的完整列表，请访问[安捷伦细胞分析学习中心网站](#)。

表 4 所需的其他产品

产品	供应商	货号
Seahorse XF96、XF24、XFe96 或 XFe24 分析仪	安捷伦科技公司	
Seahorse XF DMEM 培养基，pH 7.4* 或	安捷伦科技公司	103575-100
Seahorse XF RPMI 培养基，pH 7.4*	安捷伦科技公司	103576-100
用于分析仪的 Seahorse XF FluxPak	安捷伦科技公司	多个
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 谷氨酰胺溶液 [†]	安捷伦科技公司	103579-100

* XF DMEM 或 RPMI 培养基也可以与本表所列的补充剂作为捆绑产品一同购买（货号 103680-100 和 103681-100）。有关所有培养基类型的完整列表以及我们针对每种分析试剂盒的建议，请参阅 [Seahorse XF 培养基选择指南](#)

[†] 使用 Seahorse XF 棕榈酸氧化压力测试试剂盒（货号 103693-100）时不需要

所需的其他安捷伦产品

3

标准底物氧化压力测试实验流程

实验前一天 24

实验当天 24

使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析 30

数据示例 32

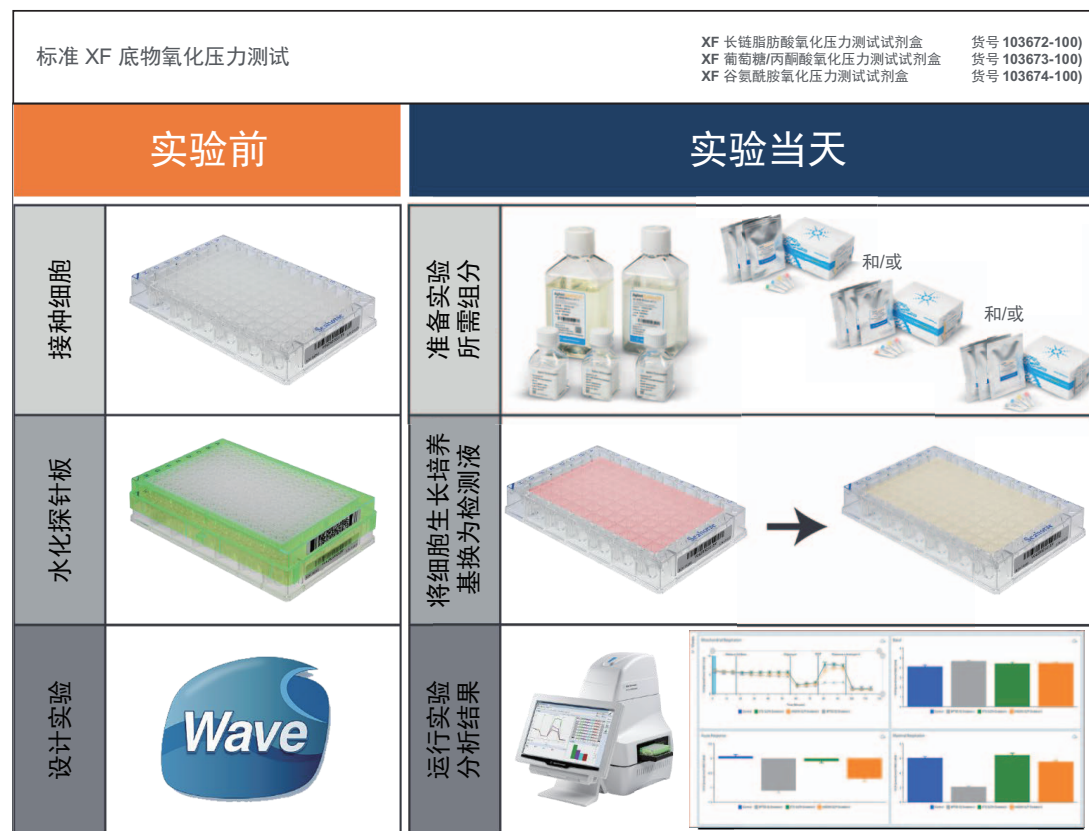


图 8. 安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试-标准实验流程

注意

实验之前，应根据您的细胞类型凭测试经验确定最佳细胞接种密度和 FCCP 浓度。如需了解更多信息，请参阅安捷伦细胞分析学习中心网站上的基本流程。

细胞系参考数据库是查找目标细胞类型相关信息的强大资源。

实验前一天

- 1 打开 Seahorse XFe/XF96 或 XFe/XF24 分析仪，预热过夜，使温度稳定（至少 5 小时）
- 2 将传感器探针板置于无菌水或蒸馏水中，于 37 °C 无 CO₂ 培养箱中水化过夜。如需了解更多信息，请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)网站上的基本流程“水化传感器探针板”
- 3 对于贴壁细胞，使用适当的细胞培养生长培养基将细胞以预定密度接种于 Seahorse XF 微孔板中。更多信息请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)网站
对于悬浮细胞，请参阅以下部分：实验当天/准备 SeahorseXF 细胞培养微孔板
- 4 在 Wave 桌面软件中使用标准底物氧化压力测试分析模板创建分析模板文件。可以根据您的特定实验设计对模板进行任何必要的组修改

实验当天

完成传感器探针板水化过程：移除水并向每个孔中加入适当体积的 XF 校准液，置于无 CO₂ 培养箱中，在 37 °C 下孵育 60 分钟。

配制检测液

- 1 配制标准底物氧化压力测试检测液：向 97 mL Seahorse XF DMEM 培养基 (pH 7.4) 补充 XF 葡萄糖、XF 丙酮酸钠和 XF 谷氨酰胺各 1.0 mL（检测液中最终浓度分别为 10 mmol/L、1 mmol/L 和 2 mmol/L）。这些是推荐的初始条件。如果需要，可以修改所需的检测液成分

表 5 标准底物氧化压力测试检测液。

组分	体积	终浓度
安捷伦 Seahorse XF DMEM 或 RPMI 培养基, pH 7.4	97 mL	-
XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	1.0 mL	10 mmol/L
XF 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液	1.0 mL	1 mmol/L
XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	1.0 mL	2 mmol/L

- 2 使用前将检测液预热至 37 °C

注意

当使用推荐的补充剂浓度时，不需要调节检测液的 pH。

准备 Seahorse XF 细胞培养微孔板

对于贴壁细胞

- 1 从 37 °C 细胞培养箱中取出细胞培养微孔板，在显微镜下检查细胞，以确认接种细胞均一，并具有适当的细胞形态
- 2 从细胞培养微孔板中移除生长培养基。用预热的检测液洗涤一次。对于 96 孔板，添加检测液至终体积为 180 μL /孔，24 孔板为 500 μL /孔。更多信息请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)
- 3 分析之前，将装有检测液的细胞培养板置于无 CO₂ 培养箱中，在 37 °C 下孵育 45 至 60 分钟
- 4 开始 XF 分析之前，再次移除检测液并向每个孔中加入预热的新鲜检测液。96 孔板的总体积应为 180 μL /孔，24 孔板应为 500 μL /孔

对于悬浮细胞

- 1 从生长培养基中收集细胞，然后在预热的检测液中重悬
- 2 对细胞计数并制成一定浓度的细胞悬浮液，使每个孔接种 50 μL (XF96/XFe96) 或 100 μL (XFe24) 该细胞悬浮液时可获得所需的细胞数，留下 4 个孔不接种细胞，作为背景校正孔
- 3 向每个孔加入所需的细胞量，然后轻轻离心使其贴壁
- 4 缓慢地向每个孔中添加检测液。96 孔板的总体积应为 180 μL /孔，24 孔板应为 500 μL /孔
- 5 在分析之前，将细胞板置于无 CO₂ 培养箱中，在 37 °C 下孵育 45 至 60 分钟

如需了解更多有关制备 XF 分析用的悬浮细胞的信息，请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)

配制化合物储备液和工作溶液

小心

使用的化合物溶液应在当天配制。请勿反复冻融。丢弃所有剩余的化合物溶液。

- 1 从试剂盒中取出一个铝箔袋和启盖器
- 2 打开铝箔袋并取出 4 个小瓶：寡霉素（蓝盖），FCCP（黄盖），鱼藤酮/抗霉素 A（红盖）和抑制剂瓶（因试剂盒而异；Etomoxir（绿盖），UK5099（橙盖）或 BPTES（灰盖））
- 3 轻敲小瓶以确保粉末在小瓶的底部，然后使用试剂盒提供的启盖器打开瓶盖

- 4 如表 6 中所述，用适当体积的检测液重悬每个小瓶中的内容物。涡旋约 1 分钟以确保化合物充分重悬。配制好的溶液即为化合物储备液

表 6 储备液。

化合物	检测液体积	储备液浓度
Etomoxir (XF 长链脂肪酸氧化压力测试试剂盒)	700 μ L	160 μ mol/L
UK5099 (XF 葡萄糖/丙酮酸氧化压力测试试剂盒)	700 μ L	80 μ mol/L
BPTES (XF 谷氨酰胺氧化压力测试试剂盒)	700 μ L	120 μ mol/L
寡霉素	420 μ L	150 μ mol/L
FCCP	720 μ L	100 μ mol/L
鱼藤酮/抗霉素 A	540 μ L	50 μ mol/L

- 5 使用化合物储备液配制工作溶液，以便上样至传感器探针板的加药孔
- 6 按表 7 (XF/XFe96 传感器探针板) 和表 8 (XF/XFe24 传感器探针板) 所示，使用检测液为每种化合物配制 2 mL 或 3 mL 的工作溶液。对于大多数细胞，建议使用 1.5 μ mol/L 寡霉素和 0.5 μ mol/L 鱼藤酮/抗霉素 A (终浓度)。应在实验之前确定最佳 FCCP 浓度

表 7 配制上样至 XFe/XF96 传感器探针板的化合物溶液。细胞板最初的检测液体积为 180 μ L/孔

	细胞孔终浓度 μ mol/L	储备液体积 (μ L)	检测液体积 (μ L)	10 \times (加药孔) μ mol/L	加入加药孔 的体积 (μ L)
加药孔 A: Etomoxir 或	4	500	1500	40	20
UK5099 或	2	500	1500	20	20
BPTES	3	500	1500	30	20
加药孔 B: 寡霉素	1.5	300	2700	15	22
加药孔 C: FCCP	0.25	75	2925	2.5	25
	0.5	150	2850	5	25
	1.0	300	2700	10	25
	2.0	600	2400	20	25
加药孔 D: 鱼藤酮/抗霉素 A	0.5	300	2700	5	27

表 8 配制上样至 XFe/XF24 传感器探针板的化合物溶液。细胞板最初的检测液体积为 500 μL /孔

	最终孔浓度 $\mu\text{mol/L}$	储备液体积 (μL)	检测液体积 (μL)	10 \times (加药孔) $\mu\text{mol/L}$	加入加药孔 的体积 (μL)
加药孔 A: Etomoxir或	4	500	1500	40	56
UK5009 或	2	500	1500	20	56
BPTES	3	500	1500	30	56
加药孔 B: 寡霉素	1.5	300	2700	15	62
加药孔 C: FCCP	0.25	75	2925	2.5	69
	0.5	150	2850	5	69
	1.0	300	2700	10	69
	2.0	600	2400	20	69
加药孔 D: 鱼藤酮/抗霉素 A	0.5	300	2700	5	75

上样至传感器探针板加药孔

适当的加药孔上样技术详见[安捷伦细胞分析学习中心](#)网站上的基本流程“化合物上样至传感器探针板”。

请在化合物上样前阅读这些信息。确保传感器探针板在使用前已正确水化。

加药孔位置请参阅图 9。

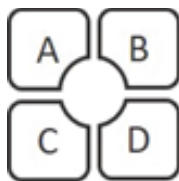


图 9. XFe96、XF96 和 XFe24 传感器探针板的加药孔布局。注意 XF24 传感器探针板的布局有所不同。有关 XF24 的加药孔布局，请参见 XF 分析学习中心

有关不同类型实验中化合物的上样体积和加药孔名称，请参阅表 9。

表 9 底物氧化压力测试加药方案的推荐加药体积。对于 96 孔细胞板，起始检测液体积为 180 μL / 孔，24 孔细胞板为 500 μL / 孔

加药孔	化合物	加药孔浓度	加入加药孔的体积	
			96 孔	24 孔
A	抑制剂 (Etomoxir、UK5099 或 BPTES)*	10x	20 μL	56 μL
B	寡霉素	10x	22 μL	62 μL
C	FCCP	10x	25 μL	69 μL
D	鱼藤酮/抗霉素 A	10x	27 μL	75 μL

* 对于对照组，应在加药孔 A 中使用检测液代替抑制剂

将模板加载至 Seahorse XFe 分析仪

注意

如果 XFe 分析仪中已有模板，请跳过此步骤。

个人计算机（需联网）

- 1 使用下面的超链接下载 **Seahorse XF 底物氧化压力测试 - 标准模板**（用于长链脂肪酸、葡萄糖 / 丙酮酸和 / 或谷氨酰胺氧化压力测试）。
www.agilent.com/cs/library/software/public/software-agilent-seahorse-xf-subox-assay-template-files-cell-analysis-agilent.zip
- 2 解压缩文件夹，然后将分析模板文件复制并粘贴到 USB 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 将 USB 驱动器插入前面的 USB 端口，等待约 10 秒
- 2 单击 **Import**（导入）（New Assay（新分析）视图的底部）
- 3 在 USB 驱动器或网络驱动器中找到要导入的分析模板文件。
- 4 单击 Windows 对话框中的 **Open**（打开）。在 XFe 分析仪的 Templates（模板）视图可以选择导入的分析模板
- 5 如有需要，再次导入下一个模板
- 6 现在可以在可用模板列表中选择导入的分析模板

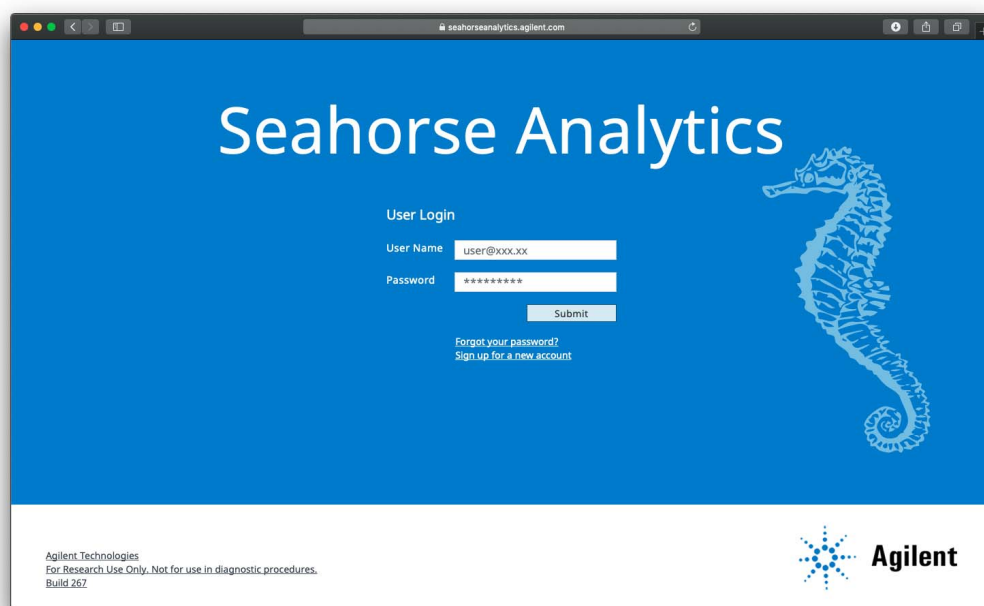
运行 XF 底物氧化压力测试分析

- 1 从可用模板列表中选择 **Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test-Standard**（Seahorse XF 底物氧化压力测试 - 标准）模板，然后单击 **Open File**（打开文件）（或双击模板）
- 2 **Group Definitions**（组定义）：根据您的实验确认或修改默认组和条件
- 3 **Plate Map**（板布局）：根据您的实验确认或修改板布局
- 4 **Protocol**（方案）：确认或修改仪器运行方案以在实验期间运行额外的测试循环
- 5 **Run Assay**（运行实验）：准备就绪后，单击 **Start Run**（开始运行）
- 6 出现提示时，请取下探针板盖子，然后将带有水化板的已加药的传感器探针板置于 Seahorse XFe 分析仪的热托盘上。确保板的放置方向正确并已取下探针板的盖子。然后，单击 **I'm Ready**（准备就绪）。校准大约需要 15 至 30 分钟
- 7 校准完成后，Wave Controller 将显示 **Load Cell Plate**（加载细胞板）对话框。单击 **Open Tray**（打开托盘）以弹出水化板并放入细胞板。放入细胞板前确保盖子已取下
- 8 单击 **Load Cell Plate**（加载细胞板）运行实验

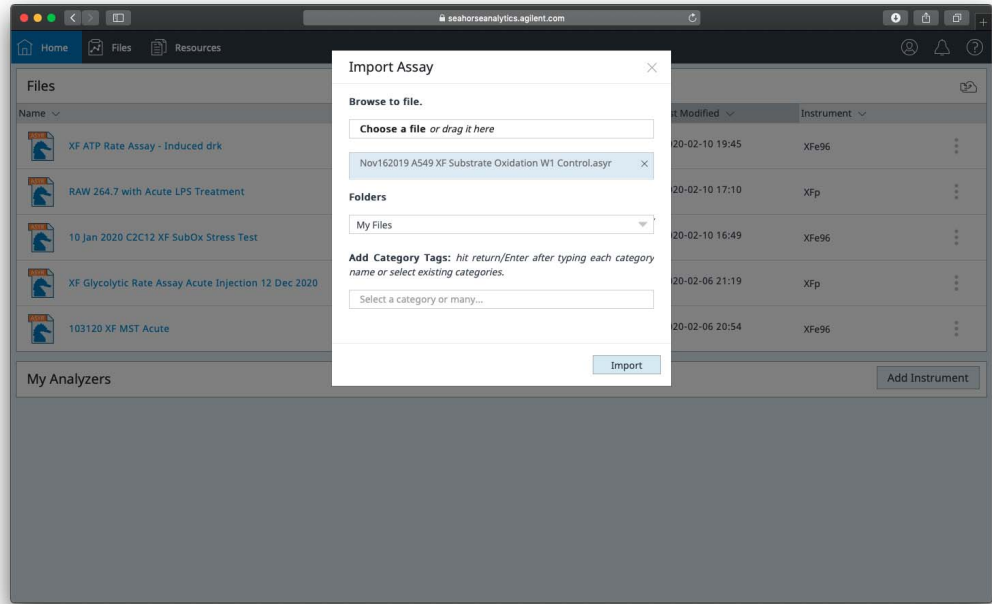
使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析

安捷伦 Seahorse Analytics 是一个基于网页的全新软件平台，为 XF 底物氧化压力测试实验提供了一个易用、精简的数据分析工作流程。Seahorse Analytics 可自动计算底物氧化压力测试参数：基础呼吸、对抑制剂的急性响应和最大呼吸。请访问 <https://seahorseanalytics.agilent.com> 注册或登录您的 Seahorse Analytics 账户。

- 1 实验完成后，使用 USB 驱动器或网络驱动器将实验结果文件传输到您的个人计算机
- 2 访问 <https://seahorseanalytics.agilent.com> 注册或登录您的 Seahorse Analytics 账户

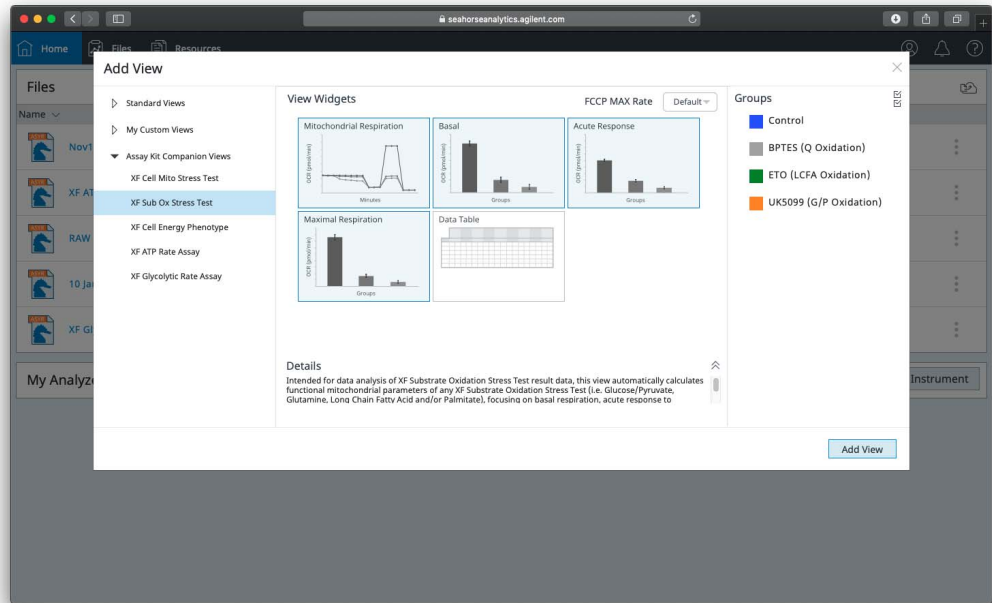


3 将分析结果文件导入您的账户



4 打开实验结果文件，选择 Assay Kit Companion（分析试剂盒）视图菜单下的 XF Substrate Oxidation Stress Test（XF 底物氧化压力测试）分析视图

5 选择要添加到分析视图的组，然后单击 **Add View**（添加视图）



数据示例

图 10 展示了来自 Seahorse Analytics 的 A549 细胞的标准底物氧化实验数据。

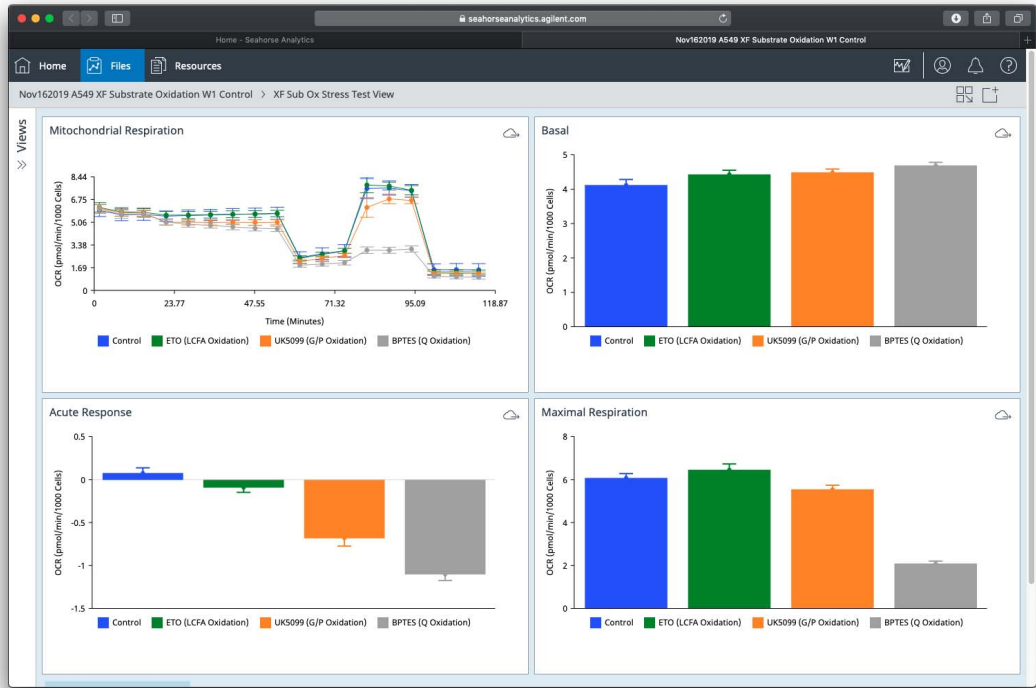


图 10. 来自安捷伦 Seahorse Analytics 的 A549 细胞的标准底物氧化实验数据

图 11 展示了 A549（图 A）、C2C12（图 B）和 HepG2 细胞（图 C）的实验数据

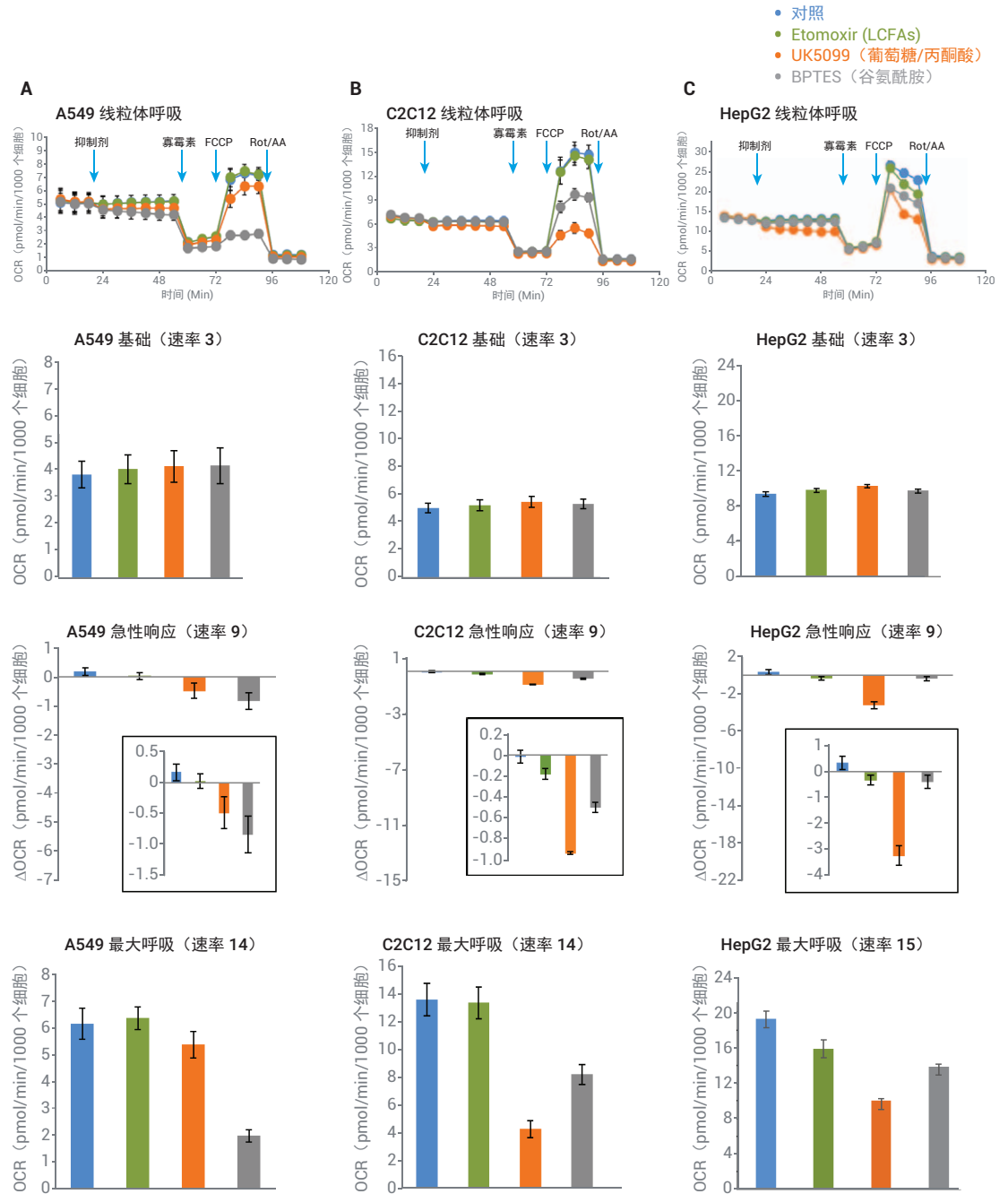


图 11. 使用 XF 葡萄糖丙酮酸、长链脂肪酸和谷氨酰胺氧化压力测试比较 A549、C2C12 和 HepG2 细胞的底物氧化。A549 (A)、C2C12 (B) 和 HepG2 (C) 细胞接种于 XF96 细胞培养板，过夜培养。对细胞进行 XF 底物氧化压力测试：添加检测液（对照）、Etomoxir (LCFA 氧化)、UK5099（葡萄糖/丙酮酸氧化）或 BPTES（谷氨酰胺氧化），然后按照常用顺序添加寡霉素、FCCP 和鱼藤酮/抗霉素 A。XF 检测液 = XF DMEM，pH 7.4，补充 10 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 丙酮酸钠和 2 mmol/L 谷氨酰胺。3 天检测 3 种细胞，使用 Seahorse Analytics 对生成的数据进行编译和处理。以 \pm SEM 的形式报告误差。使用 XFe24 分析仪获得的各细胞类型的分析结果类似（数据未展示）

结果表明，每种细胞的基础呼吸参数与预期结果相同，在添加抑制剂之前，所有条件下的基础 OCR 相同。添加抑制剂后，相对于基础分析条件下的呼吸参数，每种细胞均表现出一种可检测到的但相对较小的急性响应。然而，在最大呼吸条件下（即线粒体对底物需求更高的条件下），对抑制剂的响应显著增强，测试的各种细胞类型对不同抑制剂的不同响应变得明显。请参阅安捷伦应用简报：使用安捷伦 XF 底物氧化压力测试揭示细胞代谢表型和功能，为解释每种细胞类型的底物需求提供进一步信息，同时从癌细胞和免疫细胞生物学以及药物研发角度，为标准底物氧化压力测试实验设计提供建议。

4

棕榈酸氧化压力测试实验流程 – 进阶实验

实验前两天 36
 实验前一天 36
 实验当天 37
 使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析 42
 数据示例 44

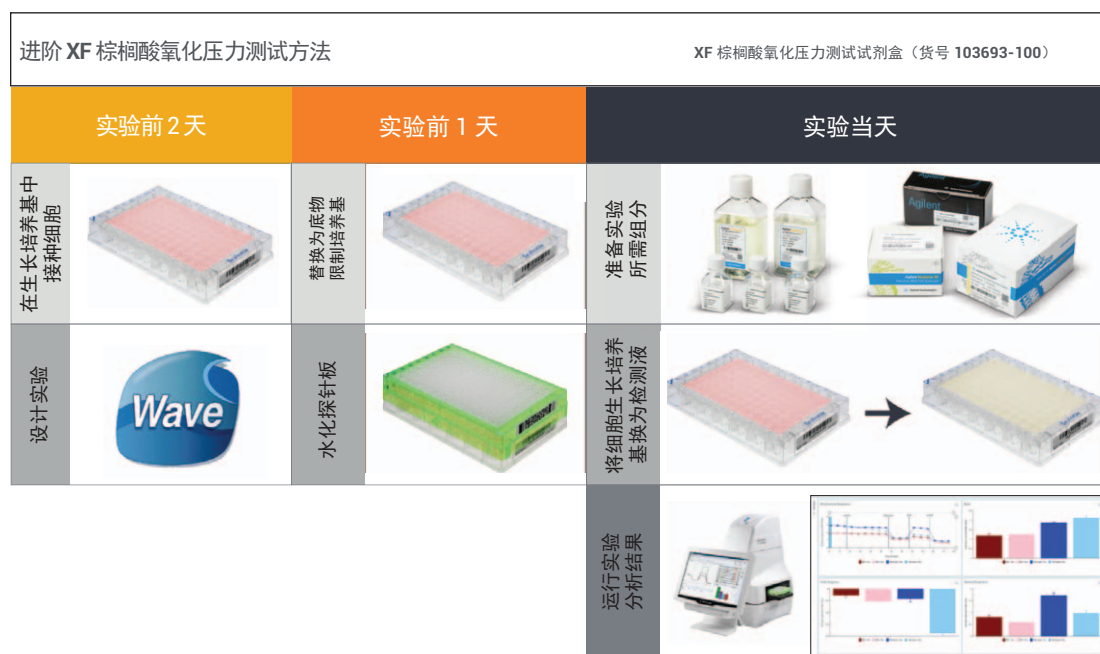


图 12. 安捷伦 Seahorse XF 棕榈酸氧化压力测试-进阶实验流程

实验前两天

对于贴壁细胞，使用适当的细胞生长培养基将细胞以预定密度接种于 Seahorse XF 细胞培养板中。更多信息请参阅[安捷伦细胞分析学习中心网站](#)。

实验前一天

配制底物限制生长培养基

- 1 从安捷伦 Seahorse 左旋肉碱盒中取出一个铝箔袋。打开铝箔袋并取出左旋肉碱瓶。拿至超净工作台中
- 2 向左旋肉碱瓶中加入 100 μL 组织培养级无菌水。得到的储备液浓度为 0.5 mol/L
- 3 在超净工作台中，将 18.5 mL 未补充的生长培养基（不含葡萄糖、丙酮酸钠、谷氨酰胺或 GlutaMAX）加入 50 mL 无菌锥形管
- 4 补充 0.5 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 谷氨酰胺或 GlutaMAX 和 1% 胎牛血清（终浓度）。再加入 20 μL 步骤 2 中制备的左旋肉碱溶液。由此得到底物限制生长培养基，左旋肉碱最终浓度为 0.5 mmol/L
- 5 将剩余的左旋肉碱储备液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。第二天还将使用该左旋肉碱溶液补充检测液

准备细胞板

- 1 对于贴壁细胞或悬浮细胞，将细胞生长培养基替换为底物限制生长培养基。建议用 PBS 或底物限制生长培养基洗涤一次细胞板，确保完全去除残留的生长培养基
- 2 对于 96 孔板，在每个孔中加入 100 μL 底物限制生长培养基，对于 24 孔板，在每个孔中加入 250 μL 底物限制生长培养基
- 3 将细胞板放回 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中

其他准备工作

- 1 打开 Seahorse XFe/XF96 或 XFe/XF24 分析仪，预热过夜，使温度稳定（至少 5 小时）
- 2 将传感器探针板置于无菌水或蒸馏水中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无 CO_2 培养箱中水化过夜。如需了解更多信息，请参阅[安捷伦细胞分析学习中心网站](#)上的基本流程“水化传感器探针板”
- 3 使用棕榈酸氧化压力测试进阶实验模板，在 Wave 桌面软件中创建分析模板文件。可以根据您的特定实验设计对模板进行任何必要的组修改

实验当天

完成传感器探针板水化过程：移除水并向每个孔中加入适当体积的 XF 校准液，置于无 CO₂ 培养箱中，在 37 °C 下孵育 60 分钟。

配制检测液

- 1 向 75 mL Seahorse XF DMEM 或 RPMI 培养基 (pH 7.4) 中补充 2 mmol/L XF 葡萄糖和 0.5 mmol/L 左旋肉碱（无丙酮酸钠或谷氨酰胺），以配制进阶棕榈酸氧化压力测试检测液。这仅是推荐的初始葡萄糖浓度，如果需要可以进行修改

表 10 进阶棕榈酸氧化压力测试检测液

组分	体积	终浓度
安捷伦 Seahorse XF DMEM 或 RPMI 培养基, pH 7.4	75 mL	-
XF 葡萄糖	150 μL	2 mmol/L
Seahorse 左旋肉碱	75 μL	0.5 mmol/L

- 2 使用前在 37 °C 下预热。（在即将开始实验前加入棕榈酸-BSA 底物。）

注意

当使用推荐的补充剂浓度时，不需要调节检测液的 pH。此外，从冰箱中取出棕榈酸-BSA 和 BSA 对照。使用前预热至 37 °C。

准备 Seahorse XF 细胞培养微孔板

对于贴壁细胞

- 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，以确认接种细胞均一，并具有适当的细胞形态
- 2 从细胞培养微孔板中移除底物限制生长培养基。用预热的检测液洗涤一次。对于 96 孔板，添加检测液至终体积为 180 μL/孔，24 孔板为 500 μL/孔。更多信息请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)
- 3 分析之前，将装有底物限制检测液的细胞板置于无 CO₂ 培养箱中，在 37 °C 下孵育 45 至 60 分钟
- 4 开始 XF 分析之前，再次移除细胞板中的检测液，并向每个孔中加入预热的新鲜检测液，96 孔板每孔 150 μL，24 孔板每孔 415 μL
- 5 最后，在即将开始分析之前，将 30 μL 1X 棕榈酸-BSA 或 30 μL 1X BSA 对照添加至 96 孔板的相应孔中。或者将 85 μL 1X 棕榈酸-BSA 或 85 μL 1X BSA 对照添加至 24 孔板的相应孔中。分析前 96 孔板的总体积为 180 μL/孔，24 孔板为 500 μL/孔

对于悬浮细胞

- 1 从生长培养基中收集细胞，然后在预热的检测液中重悬
- 2 对细胞计数并制成一定浓度的细胞悬浮液，使每个孔接种 50 μL (XF96/XFe96) 或 100 μL (XFe24) 该细胞悬浮液时可获得所需的细胞数，留下 4 个孔不接种细胞，作为背景校正孔
- 3 向每个孔加入所需的细胞量，然后轻轻离心使其贴壁
- 4 缓慢地向每个孔中添加检测液: XF96 孔板每孔 100 μL ，XF24 孔板每孔 315 μL 。现在，XF96 孔板每个孔的总体积应为 150 μL ，XF24 孔板应为 415 μL
- 5 在分析之前，将细胞板置于无 CO_2 培养箱中，在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 45 至 60 分钟
- 6 最后，在即将开始分析之前，将 30 μL 1X 棕榈酸-BSA 或 30 μL 1X BSA 对照添加至 96 孔板的相应孔中。或者，将 85 μL 1X 棕榈酸-BSA 或 85 μL 1X BSA 对照添加至 24 孔板的相应孔中。分析前 96 孔板的总体积为 180 μL /孔，24 孔板为 500 μL /孔

请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)，了解更多有关制备 XF 分析用悬浮细胞的详细信息。

配制化合物储备液和工作溶液

小心

使用的化合物溶液应在当天配制。请勿反复冻融。丢弃所有剩余的化合物溶液。

- 1 从 XF 氧化压力测试试剂盒中取出一个铝箔袋和启盖器
- 2 打开铝箔袋并取出 4 个小瓶：寡霉素（蓝盖）、FCCP（黄盖）、鱼藤酮/抗霉素 A（红盖）和 Etomoxir（绿盖）
- 3 轻敲小瓶以确保粉末在小瓶的底部，然后使用试剂盒提供的启盖器打开瓶盖
- 4 如表 11 中所述，在适当体积的制备好的检测液中重悬每个小瓶中的内容物。涡旋约 1 分钟以确保化合物充分重悬。配制好的溶液即为化合物储备液

表 11 储备液

XF 长链脂肪酸氧化压力测试试剂盒中的化合物	检测液体积	储备液浓度
Etomoxir	700 μL	160 $\mu\text{mol/L}$
寡霉素	420 μL	150 $\mu\text{mol/L}$
FCCP	720 μL	100 $\mu\text{mol/L}$
鱼藤酮/抗霉素 A	540 μL	50 $\mu\text{mol/L}$

- 5 使用化合物储备液配制工作溶液，以便上样至传感器探针板的加药孔

- 6 按照表 12 (XF/XFe96 传感器探针板) 和表 13 (XF/XFe24 传感器探针板) 所示的体积, 使用棕榈酸氧化压力测试检测液为每种化合物配制 2 mL 或 3 mL 的工作溶液。对于大多数细胞, 建议使用 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮/抗霉素 A (终浓度)。应在实验之前确定最佳 FCCP 浓度

表 12 配制上样至 XFe/XF96 传感器探针板的化合物溶液。细胞板最初的检测液体积为 180 μL / 孔

	细胞孔终浓度 $\mu\text{mol/L}$	储备液体积 (μL)	检测液体积 (μL)	10 \times (加药孔) $\mu\text{mol/L}$	加入加药孔 的体积 (μL)
加药孔 A: Etomoxir	4	500	1500	40	20
加药孔 B: 寡霉素	1.5	300	2700	15	22
加药孔 C: FCCP	0.25	75	2925	2.5	25
	0.5	150	2850	5	25
	1.0	300	2700	10	25
	2.0	600	2400	20	25
加药孔 D: 鱼藤酮/抗霉素 A	0.5	300	2700	5	27

表 13 配制上样至 XFe/XF24 传感器探针板的化合物溶液。细胞板最初的检测液体积为 500 μL / 孔

	最终孔浓度 $\mu\text{mol/L}$	储备液体积 (μL)	检测液体积 (μL)	10 \times (加药孔) $\mu\text{mol/L}$	加入加药孔 的体积 (μL)
加药孔 A: Etomoxir	4	500	1500	40	56
加药孔 B: 寡霉素	1.5	300	2700	15	62
加药孔 C: FCCP	0.25	75	2925	2.5	69
	0.5	150	2850	5	69
	1.0	300	2700	10	69
	2.0	600	2400	20	69
加药孔 D: 鱼藤酮/抗霉素 A	0.5	300	2700	5	75

上样至传感器探针板加药孔

适当的加药孔上样技术详见安捷伦细胞分析学习中心网站。

请在化合物上样前阅读这些信息。确保传感器探针板在使用前已正确水化。

加药孔位置请参阅第 27 页图 9。

有关不同类型实验中化合物的上样体积和加药孔名称, 请参阅表 14。

表 14 底物氧化压力测试加药方案的推荐加药体积。对于 96 孔细胞板，起始检测液体积为 180 μL / 孔，24 孔细胞板为 500 μL / 孔

加药孔	化合物	加药孔浓度	加入加药孔的体积	
			96 孔	24 孔
A	Etomoxir*	10x	20 μL	56 μL
B	寡霉素	10x	22 μL	62 μL
C	FCCP	10x	25 μL	69 μL
D	鱼藤酮/抗霉素 A	10x	27 μL	75 μL

* 对于对照组，应在加药孔 A 中使用检测液代替抑制剂

将模板加载至 Seahorse XFe 分析仪

注意

如果 XFe 分析仪中已有模板，请跳过此步骤。

个人计算机（需联网）

- 1 使用下面的超链接下载 **Seahorse XF 底物氧化压力测试 - 进阶模板**（用于棕榈酸氧化压力测试）。
www.agilent.com/cs/library/software/public/software-agilent-seahorse-xf-subox-assay-template-files-cell-analysis-agilent.zip
- 2 解压缩文件夹，然后将分析模板文件复制并粘贴到 USB 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 将 USB 驱动器插入前面的 USB 端口，等待约 10 秒
- 2 单击 **Import**（导入）（New Assay（新分析）视图的底部）
- 3 在 USB 驱动器或网络驱动器中找到要导入的分析模板文件
- 4 单击 Windows 对话框中的 **Open**（打开）。在 XFe 分析仪的 Templates（模板）视图可以选择导入的分析模板
- 5 如有需要，再次导入下一个模板
- 6 现在可以在可用模板列表中选择导入的分析模板

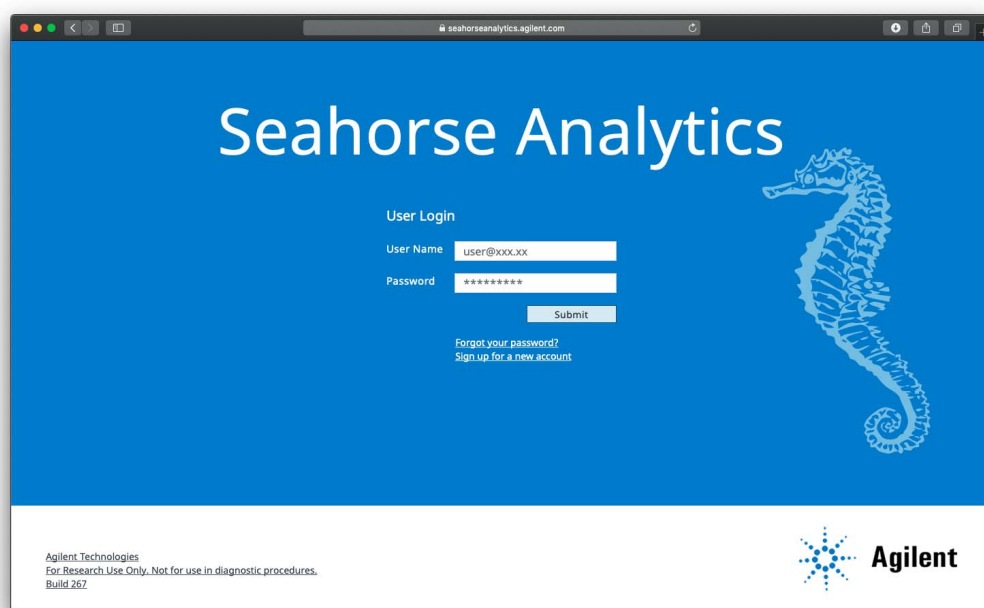
运行 XF 棕榈酸氧化压力测试实验

- 1 从可用模板列表中选择 **Seahorse XF Palmitate Oxidation Stress Test-Advanced**（Seahorse XF 棕榈酸氧化压力测试 - 进阶）模板，然后单击 **Open File**（打开文件）（或双击模板）
- 2 **Group Definitions**（组定义）：根据您的实验确认或修改默认组和条件
- 3 **Plate Map**（板布局）：根据您的实验确认或修改板布局
- 4 **Protocol**（方案）：确认或修改仪器运行方案以在实验期间运行额外的测试循环
- 5 **Run Assay**（运行实验）：准备就绪后，单击 **Start Run**（开始运行）
- 6 出现提示时，请取下探针板盖子，然后将带有水化板的已加药的传感器探针板置于 Seahorse XFe 分析仪的热托盘上。确保板的放置方向正确并已取下探针板的盖子。然后，单击 **I'm Ready**（准备就绪）。校准大约需要 15 至 30 分钟
- 7 校准完成后，Wave Controller 将显示 **Load Cell Plate**（加载细胞板）对话框。单击 **Open Tray**（打开托盘）以弹出水化板并放入细胞板。放入细胞板前确保盖子已取下
- 8 单击 **Load Cell Plate**（加载细胞板）运行实验

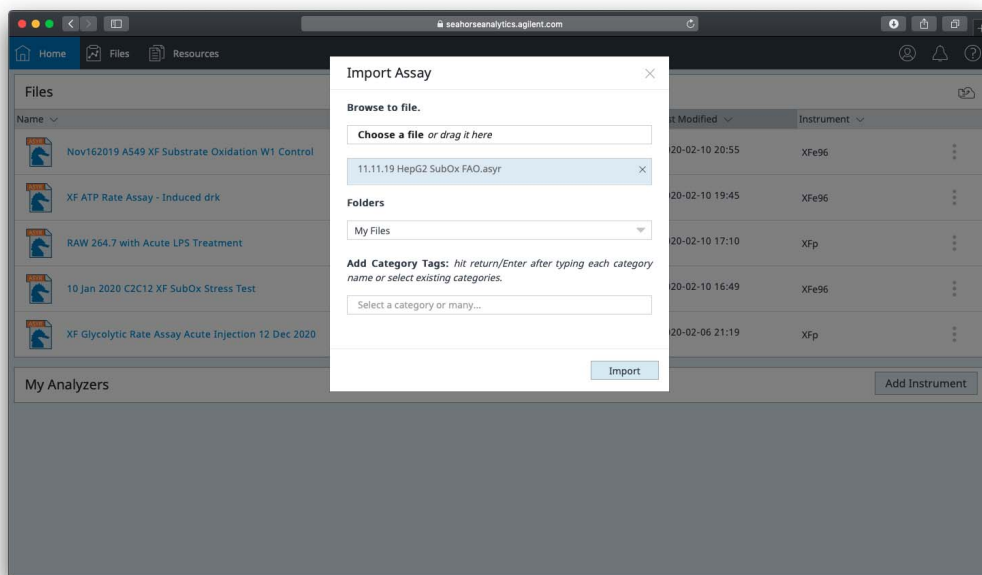
使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析

安捷伦 Seahorse Analytics 是一个基于网页的全新软件平台，为 XF 底物氧化压力测试实验提供了一个易用、精简的数据分析工作流程。Seahorse Analytics 可自动计算棕榈酸氧化压力测试参数：基础呼吸、对抑制剂的急性响应和最大呼吸。请访问 <https://seahorseanalytics.agilent.com> 注册或登录您的 Seahorse Analytics 账户。

- 1 实验完成后，使用 USB 驱动器或网络驱动器将实验结果文件传输到您的个人计算机
- 2 访问 <https://seahorseanalytics.agilent.com> 注册或登录您的 Seahorse Analytics 账户

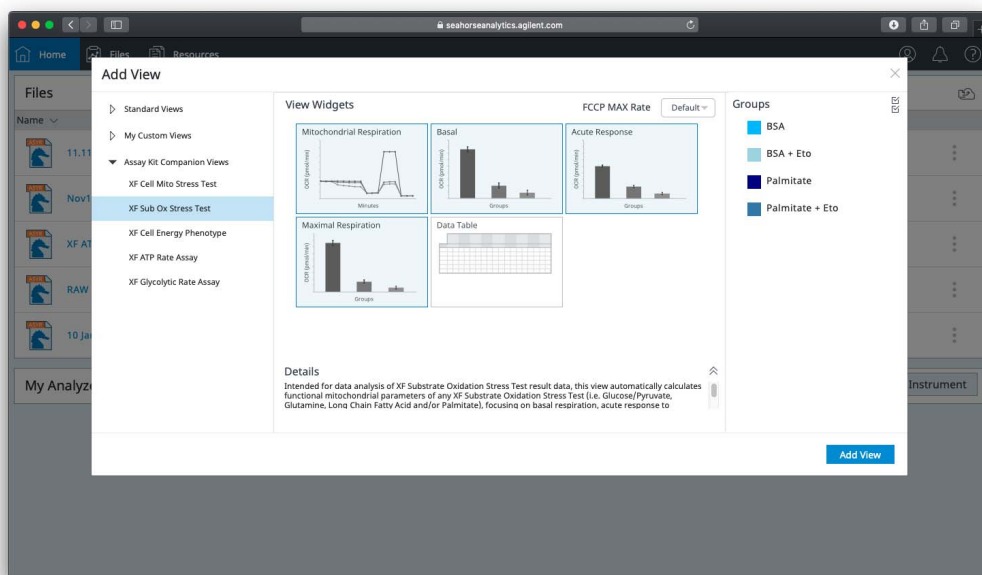


3 将实验结果文件导入您的账户



4 打开实验结果文件，选择 Assay Kit Companion（分析试剂盒）视图菜单下的 XF Substrate Oxidation Stress Test（XF 底物氧化压力测试）分析视图

5 选择要添加到分析视图的组，然后单击 **Add View**（添加视图）



数据示例

图 13 展示了来自 Seahorse Analytics 的 HepG2 细胞的进阶棕榈酸氧化实验数据。

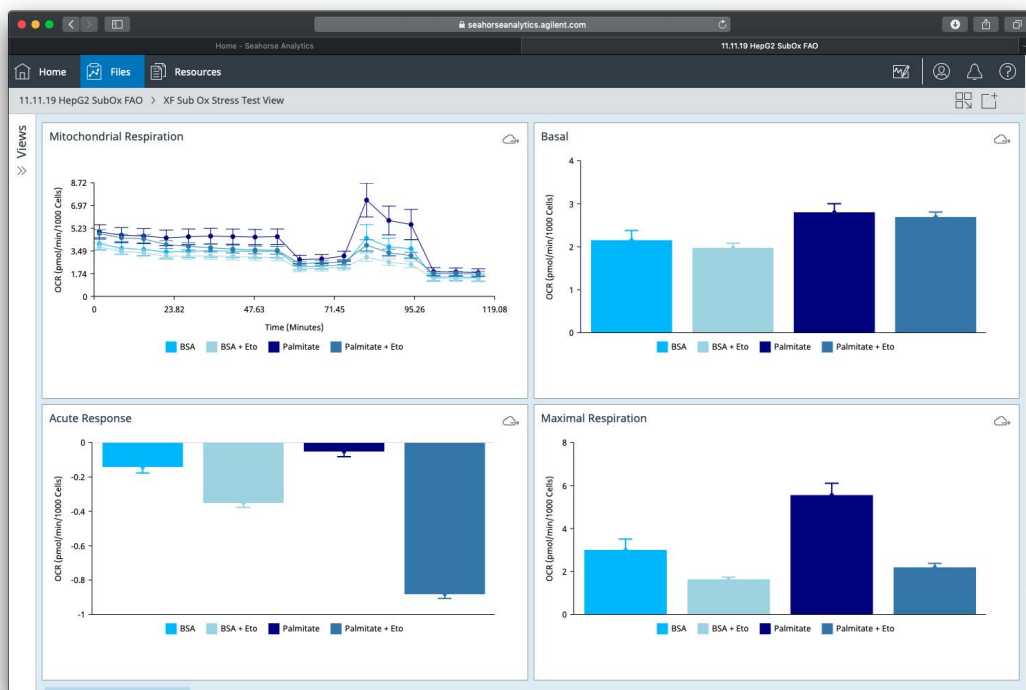


图 13. 来自 Seahorse Analytics 的 HepG2 细胞的进阶棕榈酸氧化实验数据

图 14 展示了 A549 (图 A) 和 HepG2 细胞 (图 B) 的实验数据

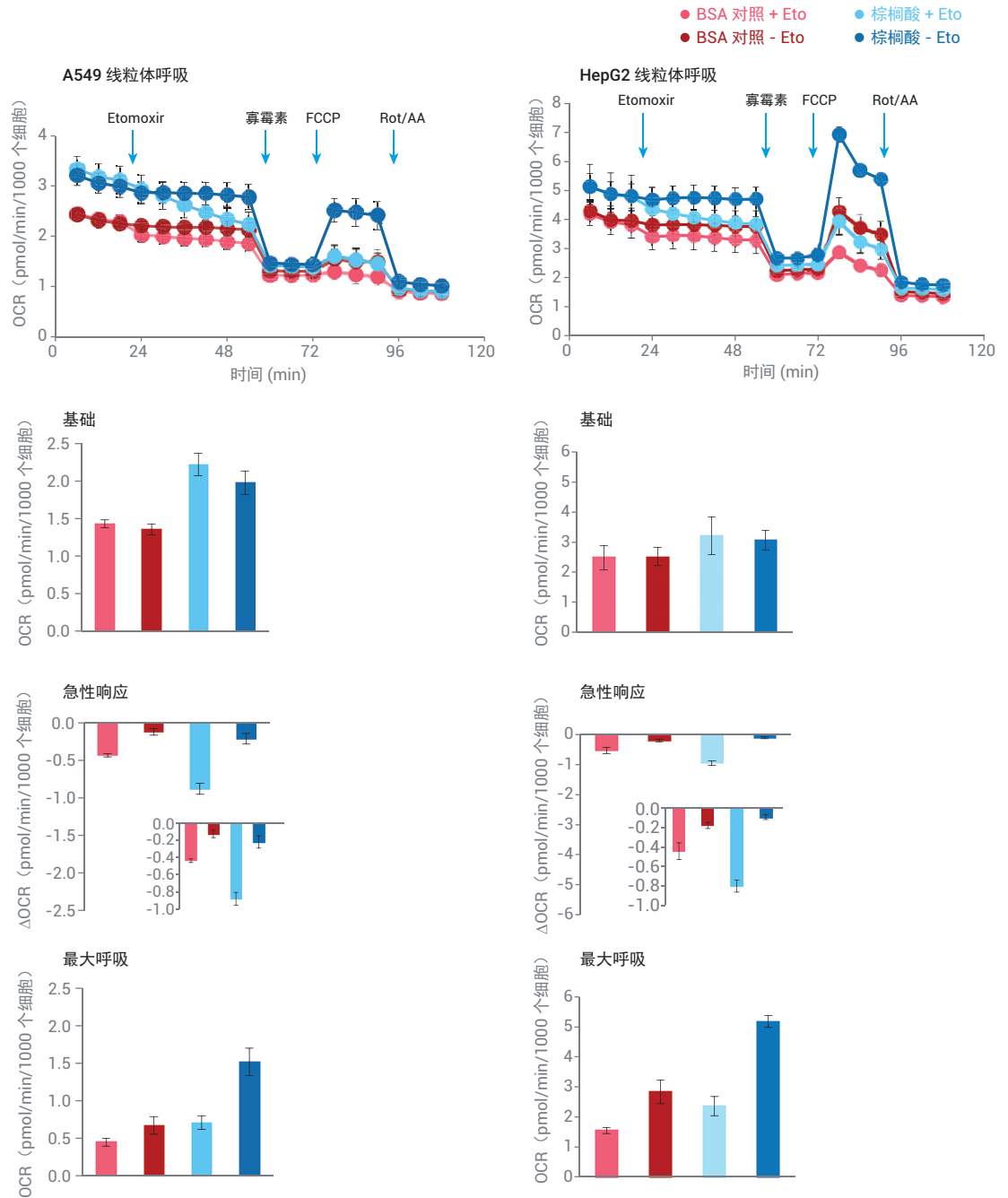


图 14. 使用 XF 棕榈酸氧化压力测试获得的 A549 和 HepG2 细胞的棕榈酸氧化情况。A549 (A) 和 HepG2 (B) 细胞接种至 XF96 细胞培养板中, 并在适当的细胞生长培养基中过夜培养。第二天将生长培养基更换为底物限制培养基 (表 1) 并继续培养 16 至 24 小时。然后, 对细胞进行 XF 棕榈酸氧化压力测试: 添加检测液 (对照) 或 Etomoxir (LCFA 氧化), 然后按照常用顺序添加寡霉素、FCCP 和鱼藤酮/抗霉素 A。XF 检测液 = XF DMEM, pH 7.4 + 2 mmol/L 葡萄糖、+ 0.5 mM 左旋肉碱。3 天检测 3 种细胞, 使用 Seahorse Analytics 对生成的数据进行编译和处理。以 \pm SEM 的形式报告误差。使用 XFe24 分析仪获得的两种细胞类型的实验结果类似 (数据未展示)

结果表明，在给定的条件下，每种细胞的基础呼吸参数与预期结果相同：与 BSA 对照组相比，棕榈酸组的 OCR 略有增加，其对 Etomoxir 敏感，抑制作用将速率降低至与 BSA 对照 - Etomoxir 组相同的速率（速率 9，约 55 分钟）。这表明一些棕榈酸在基础（较低的底物需求）状态下被氧化。然而，加入 FCCP 后，底物需求增加，并且与 BSA 和/或 + Etomoxir 组相比，棕榈酸 - Etomoxir 组的最大呼吸显著增加。这一结果表明，这些细胞类型不仅在所建立的实验条件下具有氧化棕榈酸的能力，而且当被迫以最大速率呼吸时，被氧化的底物中大部分为棕榈酸（比较棕榈酸 ± Etomoxir 组）。此数据表明，A549 和 HepG2 细胞是研究细胞干预措施（如基因操作或药物暴露）如何特异性影响长链脂肪酸氧化的良好候选细胞类型。

常见问题解答

这些分析适用于我的细胞类型吗？ 绝大部分细胞类型是适用的。底物氧化压力测试的基础是 XF 细胞线粒体压力测试，它已成功地用于多种细胞类型，包括细胞系和原代细胞。请访问 [安捷伦细胞分析出版物数据库](#)，搜索出版物中使用的细胞类型。

这些分析适用于悬浮细胞、原代细胞和/或免疫细胞吗？ 是。但是，请确保目标细胞类型遵循适当的实验和分析程序。

我需要优化细胞接种密度吗？ 是。如需了解有关细胞密度优化基本流程的更多信息，请访问 XF 分析学习中心和安捷伦细胞分析出版物数据库。注意，对于进阶棕榈酸氧化压力测试，如果对细胞进行底物限制，则可能需要降低细胞接种密度，因为这一步骤需要额外一天的细胞培养。

我需要优化 FCCP 浓度吗？ 是。对于标准底物氧化压力测试，如果目标细胞类型之前进行过细胞线粒体压力测试，则 FCCP 浓度可能与线粒体压力测试所用的 FCCP 浓度相同。

注意

对于进阶棕榈酸氧化压力测试，由于检测液中存在 BSA，可能需要增加 FCCP 的浓度。此步骤应该在进阶棕榈酸氧化压力测试前或首次实验中进行。请访问 [XF 分析学习中心](#) 和 [安捷伦细胞分析出版物数据库](#)，了解有关 FCCP 优化基本流程的更多信息。

如何确定抑制剂是否为最佳浓度？ 每种抑制剂的最佳浓度均基于安捷伦的测试以及分别在以下参考文献中提供的 Etomoxir、UK5099 和 BPTES 信息：(1) Divakaruni *et al.* 2018；(2) Hildyard *et al.* 2005；(3) Robinson *et al.* 2007。

如果对抑制剂没有响应说明什么？ 从生物学上讲，这表明在所确定的实验条件下，细胞对该底物没有需求或依赖。注意，在基础呼吸条件下（如底物需求较低的条件），对这些抑制剂的响应通常较低或无响应。

我应该增加抑制剂的浓度吗？ 不用。每种抑制剂都经过优化，以获得最佳的最终浓度：4 $\mu\text{mol/L}$ Etomoxir，2 $\mu\text{mol/L}$ UK5099 和 3 $\mu\text{mol/L}$ BPTES。增加抑制剂的浓度，特别是 Etomoxir，将导致脱靶效应，包括影响线粒体呼吸。

长链脂肪酸氧化压力测试和棕榈酸氧化压力测试有什么区别？ 长链脂肪酸氧化压力测试是 3 种标准底物氧化压力测试之一。其旨在测试在检测液中葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺底物饱和的条件下，细胞对内源性 LCFAs 的需求，尤其适合回答与 LCFAO 有关的底物需求和依赖性问题。

进阶棕榈酸氧化压力测试是在检测液中棕榈酸（棕榈酸-BSA 的形式）和左旋肉碱饱和，而葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺底物供应有限的条件下进行。当实验设计要求细胞仅氧化长链脂肪酸（如棕榈酸）以研究干预措施对长链脂肪酸氧化过程的特异性影响时，本测试尤其适用。

何时使用标准实验流程？ 标准底物氧化分析旨在回答以下类型的问题：

- 细胞对特定的底物有需求吗？
- 细胞是高度依赖于特定的底物，还是其他底物也能满足细胞的需求？
- 如果对细胞实施基因操作或药物暴露等干预措施，线粒体底物需求和/或依赖性将受到何种影响？

标准 LCFA 分析的 LCFA 来源是什么？ 长链脂肪酸来源于细胞内源性脂质/LCFAs，因此与细胞类型有关。

我是否可以/应该在标准底物氧化压力测试分析中添加棕榈酸-BSA（FAs 的来源）？ 标准底物氧化压力测试中不建议添加棕榈酸-BSA，因为先前的研究表明，在充分补充的细胞培养基和随后在 XF 检测液中葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺浓度饱和的条件下，细胞通常不会对外源棕榈酸作出响应。在相同条件下，添加棕榈酸的细胞对 Etomoxir 的响应并没有增强。如需研究细胞对棕榈酸的氧化，推荐采用进阶棕榈酸氧化压力测试分析

我可以改变底物氧化压力测试检测液的成分（针对底物）吗？ 建议从推荐的底物浓度开始，以研究饱和和底物浓度下的细胞行为。补充的葡萄糖、丙酮酸钠和谷氨酰胺的最终浓度可能会改变，但在设计实验和随后的数据解析时应谨慎。

这与 Seahorse XF 线粒体底物分析有何不同？ XF 底物氧化压力测试结合了底物通路特异性和 XF 细胞线粒体压力测试 (MST)。基础呼吸速率和最大呼吸速率是 MST 报告线粒体功能的关键指标。在底物氧化背景下，基础呼吸速率，尤其是最大呼吸速率在很大程度上受到细胞对可用底物的运输能力和氧化能力的影响⁴。因此，无论是在基础条件下还是在更高的底物需求（最大呼吸，此时细胞更多地需求/依赖关键底物）下，该方法都非常适合于评估细胞底物氧化，并且也因此不同于 mFFT。

Seahorse XF 线粒体底物分析 (mFFT) 参数（依赖性、灵活性、能力）是否适用于此？ 不适用。mFFT 定量参数不适用于这些分析。标准和进阶底物氧化压力测试均采用公认的 MST 参数（基础呼吸、急性响应和最大呼吸）。然而，请注意，这里使用诸如底物需求和依赖性等术语来定性描述细胞和线粒体功能。

可以同时加入两种（或更多）抑制剂吗？ 建议从使用单一抑制剂来研究细胞行为开始。同一组细胞可以使用两种或两种以上的抑制剂，但在设计实验和随后的数据解析时应谨慎。

何时使用进阶实验？ 进阶实验旨在回答以下类型的问题：细胞的干预措施（如基因操作或药物暴露）如何特异性影响长链脂肪酸氧化？

对于我使用的细胞（进阶流程），最佳营养缺失培养基成分是什么？ 建议根据经验确定目标细胞类型的最佳营养缺失培养基成分和暴露时间。要测试的常见参数包括降低底物限制生长培养基中葡萄糖、丙酮酸钠、血清和 GlutaMAX 的浓度，以及在进行分析之前向细胞提供该底物限制生长培养基的时间长度。

棕榈酸浓度是否饱和？ 是。当使用建议的浓度时，棕榈酸的浓度已饱和。

我可以/应该从 XF 棕榈酸氧化压力测试检测液中去掉葡萄糖吗？ XF 棕榈酸氧化压力测试检测液中的最终葡萄糖浓度应进行经验测试。不建议完全去除葡萄糖，因为细胞需要低浓度的葡萄糖来确保糖酵解和 TCA 循环的正常功能，这与棕榈酸的最佳氧化有关，并可能影响最佳氧化。

进阶实验可以应用于葡萄糖/丙酮酸和/或谷氨酰胺氧化吗？ 目前，进阶实验方法仅适用于棕榈酸氧化压力测试试剂盒。在没有其他底物的情况下，可以应用进阶实验方法特异性研究葡萄糖/丙酮酸和/或谷氨酰胺氧化，但在底物限制生长培养基和/或底物限制检测液中将葡萄糖和/或谷氨酰胺降低到亚饱和水平时，葡萄糖和谷氨酰胺需求之间的潜在干扰可能很大。优化进阶实验条件的初步建议包括在饱和和亚饱和值范围内交叉滴定葡萄糖和谷氨酰胺的浓度，以便进行初步分析。

其他 XF 试剂盒和应用中底物氧化测试的背景

安捷伦提供多种 XF 分析试剂盒，能够提供从细胞功能的广泛评估到代谢机制的具体细节的全方位信息（图 15）。从 XF 实时 ATP 速率测定开始，将其视为指南针，通过获得细胞能量代谢表型的基本信息，从而指明或揭示表型变化、代谢转换、通路影响等信息。此分析还表明合适的后续 XF 分析，以更深入地研究代谢机制和/或特定通路对细胞功能的影响。例如，分别设计 XF 细胞线粒体压力测试和 XF 糖酵解速率测定，从整个细胞角度研究线粒体和糖酵解功能。一旦发现线粒体功能发生变化，通常下一步需重点研究产生这种变化的原因，包括葡萄糖/丙酮酸、谷氨酰胺和长链脂肪酸氧化的影响。随后，这些信息可用于通过代谢编程和工程来开发控制细胞功能和表型的策略。

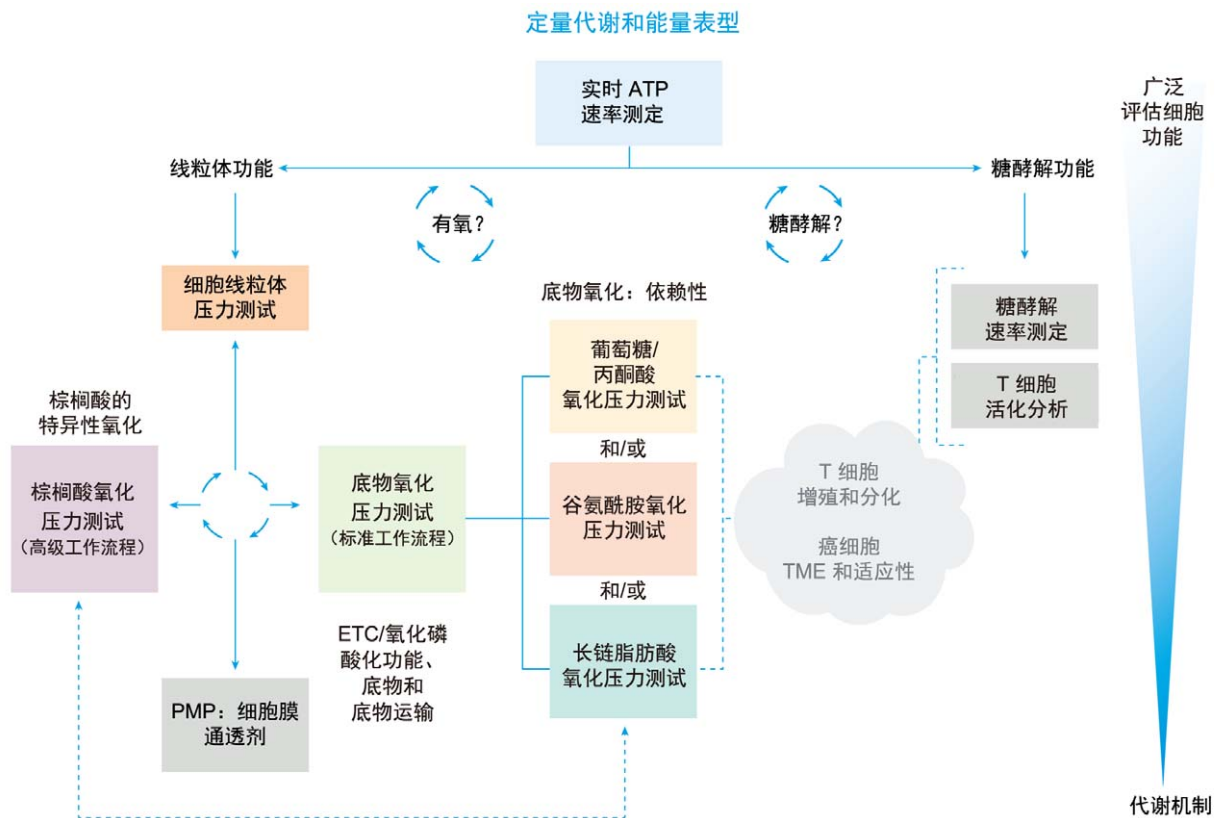


图 15. 安捷伦提供多种 XF 分析试剂盒，能够提供从细胞功能的广泛评估到代谢机制的具体细节的全方位信息。一旦发现线粒体功能发生变化，下一步需重点研究产生这种变化的原因，包括葡萄糖/丙酮酸、谷氨酰胺和长链脂肪酸氧化的影响

www.agilent.com

© Agilent Technologies 2020
第一版，2020年2月

仅限研究使用。不可用于诊断目的。



5994-1164ZHCN
修订版 B0

