

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒 用户指南

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒，
200 次测试（货号 103759-100）
安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定 96 孔板套装，
200 次测试（货号 103766-100）

声明

© 安捷伦科技有限公司 2020

根据美国和国际版权法，未经安捷伦科技公司事先同意和书面许可，不得以任何形式或采取任何手段（包括电子存储和检索或翻译成其他语言）复制本手册中的任何内容。

手册部件号

5994-1811ZH-CN

版本

第一版，2020年5月

中国出版



制造商：

安捷伦科技有限公司

300 Griffith Road

Chicopee, MA 01022

担保

本文档中的资料“照原样”提供，在未来的版本中如有变更，恕不另行通知。此外，在适用法律许可的最大范围内，安捷伦对本手册及其所包含的信息不做任何明示和默示的担保，包括但不限于适销性以及适合特定用途的默示担保。安捷伦对由于提供、使用或展示本文档或其中包含的任何信息所造成的错误、附带的损失或间接损失不承担任何责任。若安捷伦与用户有其他的书面协议，且协议中涉及本文档资料的担保条款与上述条款发生冲突，则以该书面协议为准。

技术许可

本文档所述的硬件和/或软件根据许可提供，仅能根据该许可的条款使用或复制。

受限权利说明

美国政府的受限权利。授予联邦政府的软件和技术数据权利仅包括通常提供给最终用户客户的权利。安捷伦根据 FAR 12.211（技术数据）和 12.212（计算机软件）提供软件和技术数据的常规商用许可，而对于国防部，依据的法律条文为 DFARS 252.227-7015（技术数据 - 商用品）和 DFARS 227.7202-3（商用计算机软件或计算机软件文档的权利）。

安全须知

小心

小心提示表示有危害。提醒您在某个操作步骤、某项操作或类似情况中需要注意，如果执行不当或未按照提示操作，会导致产品损坏或重要数据丢失。在完全理解并满足指定条件之前，请勿忽略小心提示继续进行操作。

警告

警告提示表示有危险。提醒您在某个操作步骤、某项操作或类似情况中需要注意，如果执行不当或未按照提示操作，会导致人身伤害或死亡。在完全理解并满足指定条件之前，请勿忽略警告提示继续进行操作。

目录

1 前言

实验背景	6
术语表	9
参考文献	10

2 试剂盒信息

试剂盒内容物	12
试剂盒的运输和储存	13
所需的其他产品	13

3 实验流程

实验前一天（第1天）	16
实验当天（第2天）	16
使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析	20

4 HS Mini、XFp 和 XFe24 分析仪指南

与 HS Mini 和 XFp 分析仪配套使用	24
与 XFe24 分析仪配套使用	24

5 常见问题解答

1

前言

实验背景 6

术语表 9

参考文献 10

实验背景

糖酵解活性快速增加是 T 细胞活化的早期标志性事件，并且是后续 T 细胞增殖和分化所必需的^[1-3]。研究已证明，细胞糖酵解活性是 T 细胞活化的一个可靠的衡量标准^[4]。安捷伦 Seahorse XF 技术是一个用于体外测量细胞生物能量代谢的活细胞分析平台。利用 XF 平台，通过测量质子释放率 (PER) 来评估细胞糖酵解活性^[5]。

安捷伦 Seahorse XF T 细胞活化测定旨在通过监测活化剂诱导的糖酵解反应来测量 T 细胞活化。这种快速分析方法为区分活化反应提供了一个早期窗口，而这通常无法通过检测基因表达、细胞增殖或细胞因子生成的正交方法来实现^[1,3]。Seahorse XF T 细胞活化测定还能提供动态信息，用于实时监测和调节 T 细胞活化，可用于比较不同的 T 细胞亚型以及评估细胞对药物或遗传干预的响应。在 Seahorse XF T 细胞活化测定中，通过共刺激 CD3 和 CD28 表面配体实现 T 细胞活化，这是体外 T 细胞活化的一种常用方法（图 1）。

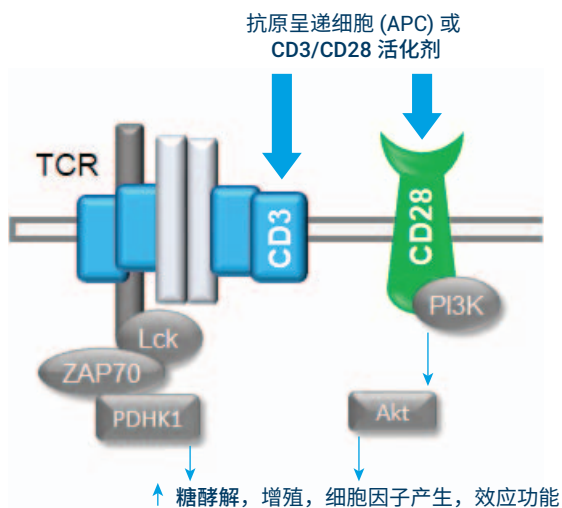


图 1. T 细胞活化诱导糖酵解增加

Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒专为人 (Hu) T 细胞而设计，包含 2 种试剂：ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂和 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG)。ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂 (STEMCELL Technologies, Inc.) 由可溶性四聚体抗体复合物组成，可结合 CD3 和 CD28 细胞表面配体，为 T 细胞活化提供所需的初级和共刺激信号。2-DG 是一种葡萄糖类似物，通过竞争性抑制中断糖酵解，消除 T 细胞活化相关的糖酵解增加。它在 Seahorse XF T 细胞活化测定中用作阴性对照。

XF T 细胞活化测定支持两种实验设计：标准实验用于检测 T 细胞活化，调节实验用于研究调节剂的急性效应（图 2）。标准实验包括两次加药：加入活化剂，然后加入 2-DG（图 2A）。它通常用于比较不同供体 T 细胞或干预措施（例如，遗传操控和/或慢性化合物暴露）下 T 细胞的活化潜力。调节实验需要在加入活化剂之前加入测试化合物（图 2B）。此实验设计可以测试和监测测试化合物对 T 细胞活化潜力的急性效应。

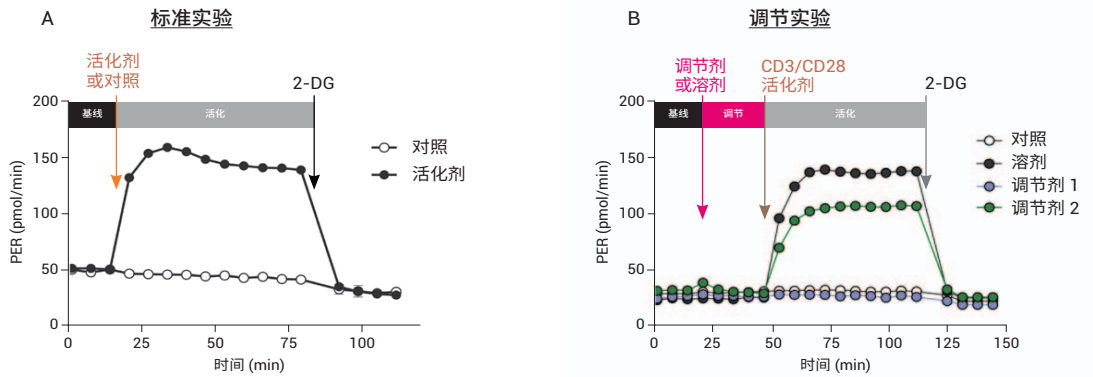
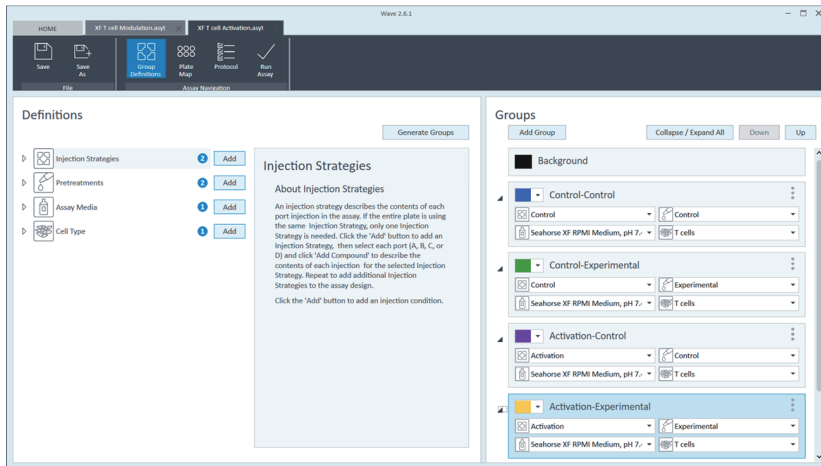
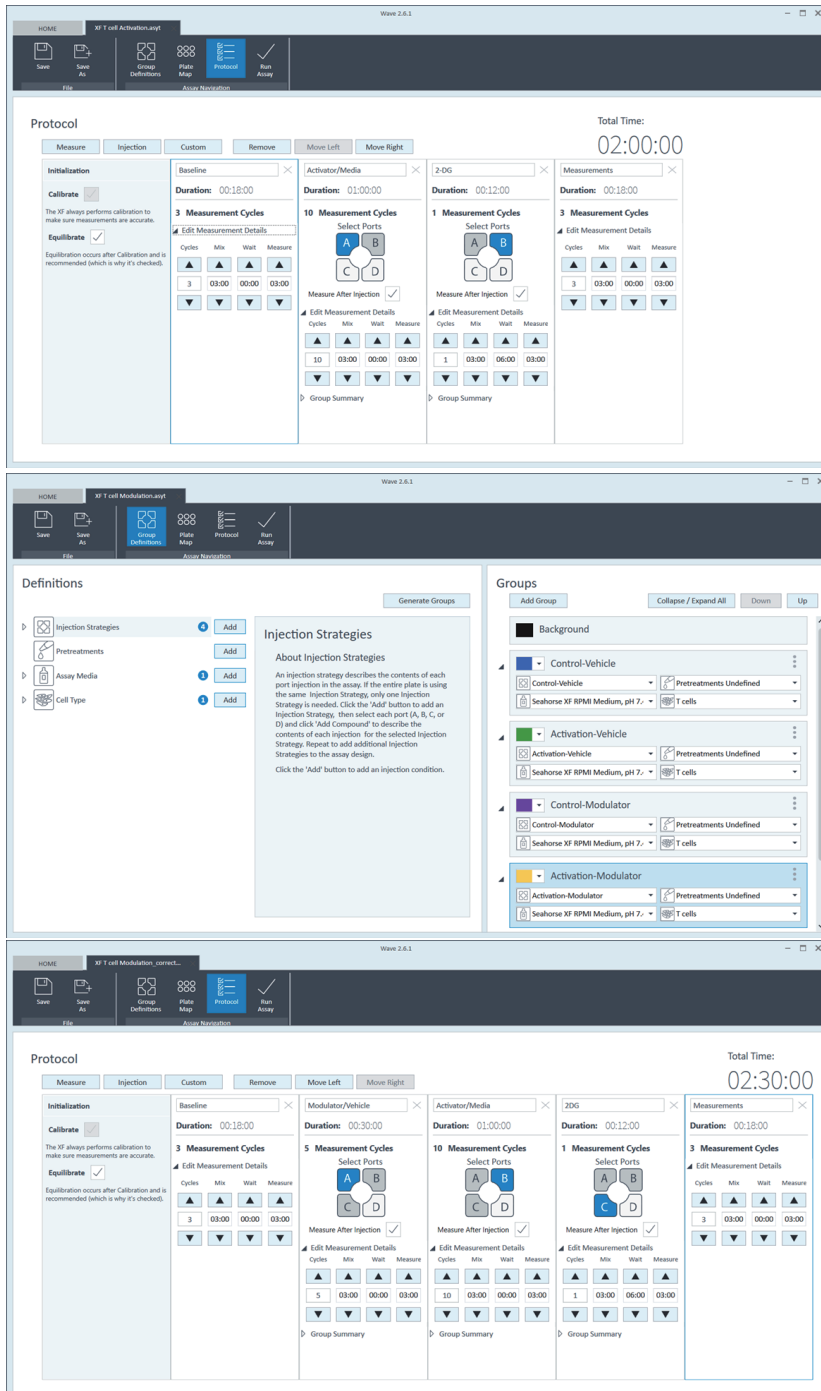


图 2. 安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定动力学曲线示例，展示了标准实验 (2A) 和调节实验 (2B) 的工作流程。活化信号表示为绝对 PER (pmol/min) 或相对于加入活化剂或化合物前的基础速率的 PER 百分比。PER% 信号有助于归一化孔之间因细胞数量引起的活化潜力差异，确保提供一致的结果

可以使用图 3 所示的相应的 XFT 细胞活化测定模板设计开展标准实验和调节实验。这些用于标准实验 (图 3A 和 3B) 和调节实验 (图 3C 和 3D) 的默认模板设计在加入活化剂和 2-DG 后分别进行 10 个循环和 4 个循环的 PER 测量。加入 2-DG 之后，在后续测量命令之前，仪器命令方案中还包括 6 分钟的等待时间，用于防止加入 2-DG 给 ECAR 测量造成任何潜在的瞬态扰动。



A XFe 96 分析仪标准实验模板中的起始组定义。在此处，用户可以定义细胞类型或用于对照组和活化组的预处理。



B

XFe 96 分析仪标准实验模板中的仪器方案，调整后可用于 XF 96 分析仪。

C

XFe 96 分析仪调节实验模板中的起始组定义。在此处，用户可以定义用于对照组和/或活化组的调节剂。

D

XFe 96 分析仪调节实验模板中的仪器方案，调整后可用于 XF 96 分析仪。

图 3. 安捷伦 Seahorse XF T 细胞活化测定的实验模板设计

可以使用 Seahorse Analytics 通过两种方法定量安捷伦 Seahorse XF T 细胞活化测定信号。第一种方法考虑基础 PER 信号和最大 PER 信号之间的差异。第二种方法考虑加入 CD3/CD28 活化剂的时间点与加入 2-DG 的时间点之间的曲线下面积 (AUC)。

本用户指南详细介绍了如何执行安捷伦 Seahorse XF T 细胞活化测定以及如何量化分析结果。

术语表

CD3/CD28 活化剂： 用于同时刺激 CD3 和 CD28 配体以模拟抗原呈递细胞的两种抗体的物理复合物。

糖酵解： 将葡萄糖转化为乳酸的过程。

质子释放率 (PER)： 随着时间的推移，细胞输出到分析培养基中的质子数，以 pmol/min 表示。

2-DG： 竞争性抑制葡萄糖摄取的葡萄糖类似物，可以抑制糖酵解。

基础质子释放率： 加入试剂之前最后一次测量的质子释放率。

基线： 加入 CD3/CD28 活化剂之前最后一次测量的质子释放率。

标准实验： 一种先加入 T 细胞活化剂，然后加入 2-DG 的实验设计。用于比较细胞群之间的活化潜力。

调节实验： 一种在加入活化剂之前需要准确加入测试化合物的实验设计。用于研究 T 细胞活化的调节剂。

最大速率： 使用最小二乘法通过最佳拟合曲线定量评估 T 细胞活化潜力。

曲线下面积 (AUC)： 通过计算加入活化剂的时间点与加入 2-DG 的终止分析时间点之间的累积效应来定量测量 T 细胞活化潜力。

参考文献

- 1 Gubser, P. M. *et al.* Rapid Effector Function of Memory CD8+ T Cells Requires an Immediate-Early Glycolytic Switch. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1064-1072
- 2 Menk, A. V. *et al.* Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 1509-1521
- 3 Jones, N. *et al.* Akt and STAT5 Mediate Naïve Human CD4+ T-Cell Early Metabolic Response to TCR Stimulation. *Nature Comm.* **2019**, *10*, 152-160
- 4 Kam, Y. 等, “使用安捷伦 **Seahorse XF Hu T** 细胞活化测定试剂盒实时检测和调节人 T 细胞活化”, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号: 5994-1983ZHCHN
- 5 Romero, N. *et al.* Quantifying Cellular Glycolytic Rate Using CO₂-Corrected Extracellular Acidification (使用 CO₂ 校正的细胞外酸化定量分析细胞糖酵解速率), 安捷伦科技公司白皮书, 出版号: 5991-7894EN-D4, **2017**

2

试剂盒信息

试剂盒内容物	12
试剂盒的运输和储存	13
所需的其他产品	13

试剂盒内容物

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒包含 1 瓶 (2 mL) ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂 (STEMCELL Technologies, Inc.) 和 2 瓶 2-DG。每个试剂盒足以进行 200 次测试, 相当于 2 次 96 孔式全板分析。

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定 96 孔板套装包含 1 个 XF Hu T 细胞活化测定试剂盒, 2 个带 PDL 细胞培养微孔板的 XFe96 FluxPak 和 100 mL 校准液。参见表 1。

表 1 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒和分析套装内容物

组分	瓶盖颜色	数量
Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒内容物 (货号 103759-100)		
ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂	透明	1 × 2 mL
2-脱氧-D-葡萄糖	绿色	2 × 1.5 mmol
Seahorse XF Hu T 细胞活化测定 96 孔板套装内容物 (货号 103766-100)		
ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂	透明	1 × 2 mL
2-脱氧-D-葡萄糖	绿色	2 × 1.5 mmol
XFe96 探针板	-	2
XFe96 PDL 细胞培养微孔板	-	2
校准液	白色	100 mL

试剂盒的运输和储存

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒放置在装有冰袋的隔热容器中运输，可最大限度地降低高温暴露。收到货后应立即将试剂盒置于 4 °C 冰箱中储存。含有 PDL 细胞培养板的 Seahorse XFe96 FluxPak 和校准液于环境温度下运输，并在室温下储存。

所有产品自生产之日起可稳定保存一年。产品包装盒标签上印有有效期。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。

所需的其他产品

进行 Seahorse XF T 细胞活化测定还需要以下产品，但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 2 所需的其他产品

产品	供应商	货号
Seahorse XF XFe96/XF96 分析仪	安捷伦科技公司	-
Seahorse XF FluxPak*	安捷伦科技公司	-
Seahorse XF RPMI 培养基, pH 7.4 [†]	安捷伦科技公司	103576-100
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

* Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒（货号 103759-100）不包括进行 XF T 细胞活化测定所需的任何 FluxPak。如果购买 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒，则需要单独购买相应的 XF FluxPak 以进行分析

† XF RPMI 培养基也可以与本表所列的补充剂一起以套装形式购买（货号 103681-100）

2 试剂盒信息

所需的其他产品

3

实验流程

实验前一天（第 1 天）	16
实验当天（第 2 天）	16
使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析	20

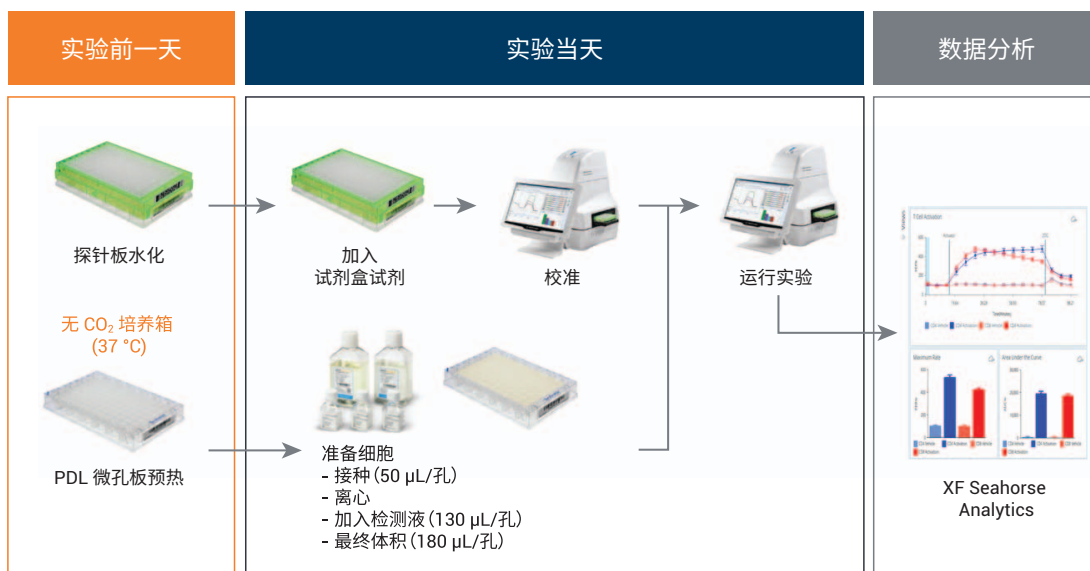


图 4. 安捷伦 Seahorse XF T 细胞活化测定工作流程

注意

分析之前，应根据您的细胞类型凭经验确定最佳细胞接种密度。相关建议，请参阅表 4 和常见问题解答部分。如需了解更多信息，请访问[安捷伦细胞分析学习中心网站](#)。

[细胞系参考数据库](#)是查找同行评审研究文章中发表的相关信息的强大资源。

实验前一天（第1天）

打开 Seahorse XFe96/XF96 分析仪，预热过夜，使温度稳定。按照以下步骤水化探针板，预热 XF 细胞培养微孔板并设计分析模板：

- 1 打开 XFe96 细胞外流量分析试剂盒，取出一个探针板。
- 2 将探针板倒置于工具板旁边。
- 3 向工具板的每个孔中加入 200 μL 组织培养级无菌水。
- 4 将探针板降低到工具板上，将探针浸入水中。
- 5 确定水位足够高，可使探针保持浸没状态。
- 6 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无 CO_2 培养箱中过夜。
- 7 从试剂盒中取出一个预包被 PDL 的 XFe96 细胞培养板，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无 CO_2 培养箱中，过夜预热培养板，无需控制湿度。
- 8 在 Wave 桌面软件中使用 Assay Template（分析模板）创建分析模板文件。请参阅第 8 页图 3 推荐的分析设置。可以根据您的特定分析设计对模板进行任何必要的组修改。

注意

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。

实验当天（第2天）

完成探针板水化过程：移除水并向每个孔中加入 200 μL 预热的 XF 校准液，置于无 CO_2 培养箱中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 分钟。

制备分析培养基

- 1 制备 T 细胞活化分析培养基：向 97 mL Seahorse XF RPMI 培养基 (pH 7.4) 补充 XF 葡萄糖、XF 丙酮酸和 XF 谷氨酰胺各 1.0 mL（分析培养基中最终浓度分别为 10 mmol/L、1 mmol/L 和 2 mmol/L）。这些是推荐的初始条件。

表 3 标准 XF T 细胞活化分析培养基

组分	体积 (mL)	最终浓度 (mmol/L)
Seahorse XF RPMI 培养基, pH 7.4	97	-
XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	1.0	10
XF 100 mmol/L 丙酮酸溶液	1.0	1
XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	1.0	2

- 2 预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

注意

当使用推荐的 XF 补充剂浓度时，不需要调节分析培养基的 pH。

在 Seahorse XFe96 PDL 细胞培养微孔板中接种 T 细胞

- 1 从生长培养基中离心收集 T 细胞，然后在预热的分析培养基中重悬。
- 2 对细胞计数，将初始 T 细胞和记忆 T 细胞的浓度稀释至 4.0×10^6 个细胞/mL 或将效应 T 细胞的浓度稀释至 2.0×10^6 个细胞/mL。
- 3 将 50 μ L 细胞悬浮液转移至各个孔中，留下 4 个角上的孔 (A1、A12、H1、H12) 作为背景校正孔。
- 4 缓慢离心（例如 200 \times g，1 分钟），使细胞粘附到孔板上。预期的最终细胞密度：初始 T 细胞和记忆 T 细胞为 2.0×10^5 个细胞/孔，活化 T 细胞（即效应 T 细胞）为 1.0×10^5 个细胞/孔。参见表 4。
- 5 向每个含有细胞的孔中缓慢加入 130 μ L 分析培养基。总体积应为 180 μ L/孔。
- 6 向 4 个角上的孔 (A1、A12、H1、H12) 中分别加入 180 μ L 分析培养基，用作背景校正孔。
- 7 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。

表 4 XFT 细胞活化测定的标准细胞接种条件

细胞类型	细胞悬浮液 (个细胞/mL)	接种体积 (μ L/孔)	预期的最终细胞密度 (个细胞/孔)
初始 T 细胞	4.0×10^6	50	2.0×10^5
活化 T 细胞	2.0×10^6	50	1.0×10^5

配制试剂的 10 \times 工作溶液（见表 5）

- 1 从试剂盒中取出 1 瓶 2-DG，用 3 mL 分析培养基重悬内容物。涡旋以确保化合物与溶液充分混合。此溶液可直接上样至加药口。

注意

重悬的 2-DG 溶液可以分装成等分试样在 -20 °C 下保存长达 6 个月。

- 2 在细胞培养罩中，将 1 mL CD3/CD28 T 细胞活化剂分装至 1 个新试剂瓶中。将原试剂瓶中剩余的活化剂溶液置于 4 °C 下储存。
- 3 向分装的活化剂溶液中加入 1 mL 分析培养基（1:1 稀释）。此溶液可直接上样至加药口。
- 4 如果进行调节实验，则根据所需的最终浓度用分析培养基配制 10 \times 浓度的调节剂溶液。

注意

如果调节剂的储备液含有 DMSO，建议 10 \times 工作溶液中的 DMSO 浓度小于 1%。

3 实验流程

上样至探针板加药口

表 5 配制 10x 工作溶液

试剂	10x 工作溶液
活化剂	与分析培养基 1:1 混合
2-DG	使用 3 mL 分析培养基重悬
测试化合物	使用分析培养基配制为 10x 浓度

上样至探针板加药口

适当的加药口上样技术详见安捷伦细胞分析学习中心网站上的设置 XF 分析 → 上样部分。请在化合物上样前阅读这些信息。

确保探针板在使用前已正确水化。

加药口名称请参阅图 5。

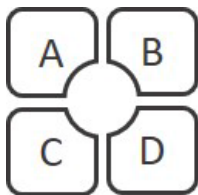


图 5. 探针板的加药口布局

标准实验 在 CD3/CD28 T 细胞活化剂之前没有加入任何试剂。

调节实验 在 CD3/CD28 T 细胞活化剂之前加入测试化合物。

有关不同类型分析中溶液的上样体积和加药口名称，请参阅表 6。

表 6 分析类型、加药口和建议的体积。96 孔细胞板的起始分析培养基体积为 180 μ L/ 孔

加药口	标准实验		调节实验	
	10x 溶液	上样体积	10x 溶液	上样体积
加药口 A	活化剂	20 μ L	测试化合物	20 μ L
加药口 B	2-DG	22 μ L	活化剂	22 μ L
加药口 C	-	-	2-DG	25 μ L

将分析模板加载至 Seahorse 分析仪

注意

如果分析仪中已有模板，请跳过以下步骤 1 至 6。

- 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 XFe96/XF96 分析仪的 *Templates*（模板）视图中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 T 细胞活化测定

- 1 从可用模板列表中选择一种 **T Cell Activation Assay**（T 细胞活化测定）模板（标准实验或调节实验）或用户创建的模板，然后单击 **Open File**（打开文件）（或双击模板）。
- 2 组定义：根据您的分析确认或修改默认组和条件。
- 3 板布局：根据您的分析确认或修改板布局。
- 4 方案：无需采取任何措施 — 在分析过程中确认或修改仪器方案以进行额外的测试循环。
- 5 运行分析：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，然后将带有工具板的已上样的探针板置于 Seahorse XF 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）以弹出工具板并放入细胞板。放入细胞板前确保盖子已取下。
- 8 单击 **Load Cell Plate**（加载细胞板）运行分析。

使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析

安捷伦 Seahorse Analytics 是一个基于网页的软件平台，为分析 XF T 细胞活化测定结果提供了一个易用、精简的数据分析工作流程。使用此工具，可以通过两种方法量化 XF T 细胞活化动力学数据：活化事件后获得的最大 PER 和 AUC（糖酵解活性的累积）（图 6）。

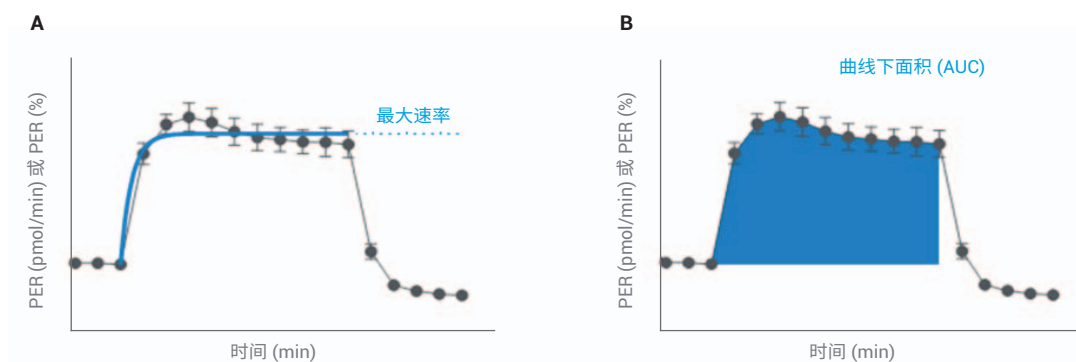
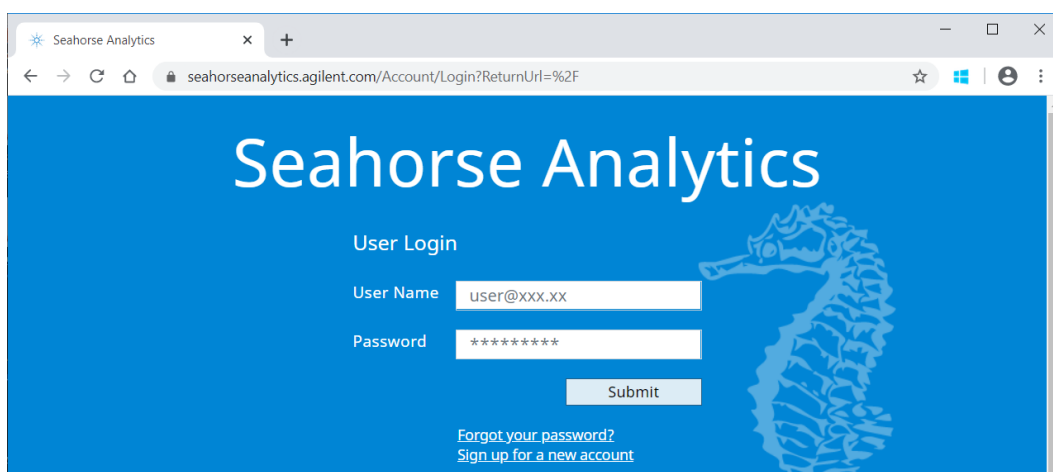


图 6. 数据分析方法示意图：最大 PER (A) 以及 CD3/CD28 活化剂加药时间点和 2-DG 加药时间点之间的 AUC (B)

以 4 种视图提供分析数据：动力学视图；通过曲线拟合估计的最大 PER 的柱状图；曲线下面积 (AUC) 柱状图；每组的平均值和标准偏差数据表。步骤 5 中的所有 4 种视图可以在进行或不进行基线归一化的情况下显示。

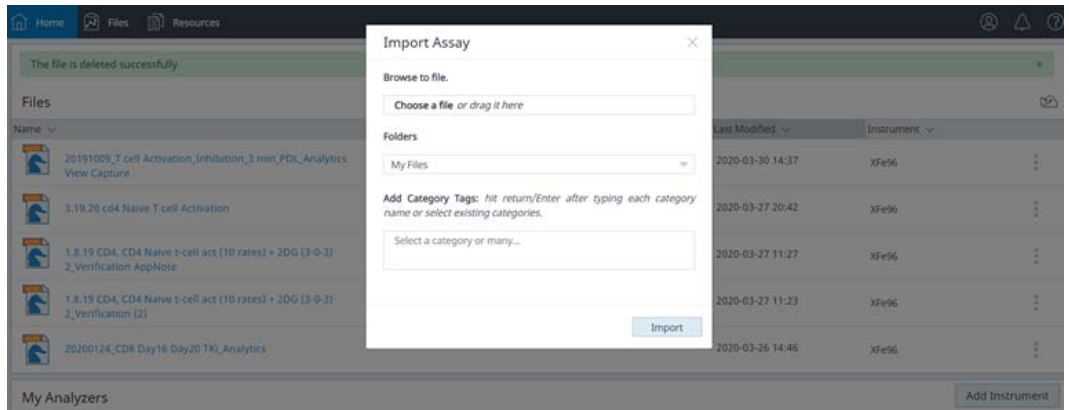
- 1 分析完成后，使用 USB 驱动器或网络驱动器将分析结果传输到您的个人计算机。
- 2 访问 <https://seahorseanalytics.agilent.com> 注册或登录您的 Seahorse Analytics 账户。



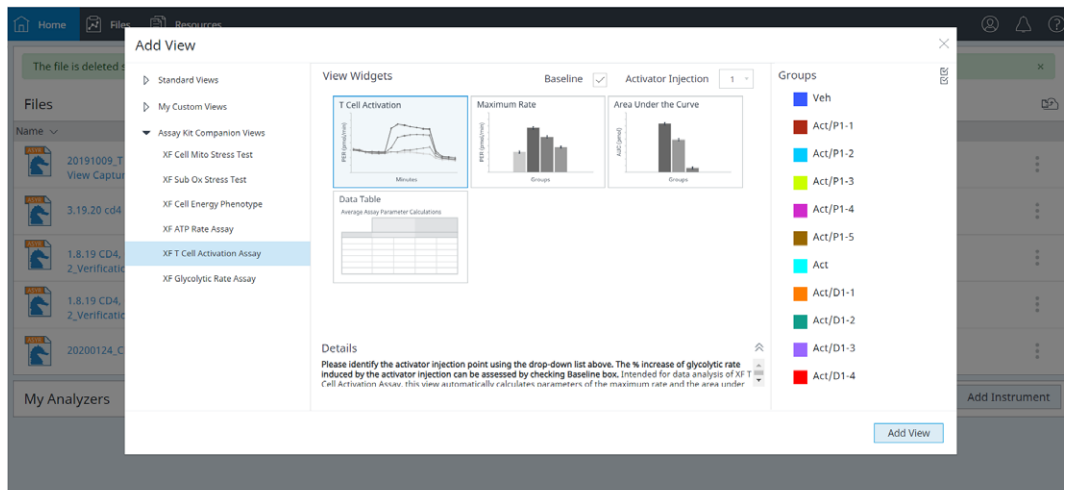
3 实验流程

使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析

- 3 将分析结果文件导入您的账户。



- 4 打开分析结果文件，选择 Assay Kit Companion Views（分析试剂盒配套视图）菜单下的 XF T Cell Activation Assay（XF T 细胞活化测定）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）。



3 实验流程

使用安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据分析

4

HS Mini、XFp 和 XFe24 分析仪指南

与 HS Mini 和 XFp 分析仪配套使用	24
与 XFe24 分析仪配套使用	24

与 HS Mini 和 XFp 分析仪配套使用

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒（货号 103759-100）可用于在 HS Mini 和 XFp 分析仪上进行分析，与第 3 节中描述的使用 XFe96/XF96 分析仪的工作流程或步骤一致。由于 Seahorse XFp 细胞培养迷你微孔板和 Seahorse XFe96 细胞培养微孔板的孔形状相同，因此使用 XFp 细胞培养迷你微孔板和 XFe96 细胞培养微孔板进行分析时，细胞接种密度和体积（第 17 页表 4）以及每个孔的加样体积（第 18 页表 6）完全相同。

由于每个 XFp 细胞培养迷你微孔板仅包含 8 个孔，因此每个孔板所需的分析培养基和 10× 工作溶液的量减少了。通常，每个 XFp 细胞培养迷你微孔板仅需 1/10 的量（10 mL 分析培养基，100 μ L T 细胞活化剂溶液和 300 μ L 2-DG）（表 7）。

表 7 标准 XFp T 细胞活化分析培养基

组分	体积 (mL)	最终浓度
Seahorse XF RPMI 培养基, pH 7.4	9.7	-
XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	0.1	10 mmol/L
XF 100 mmol/L 丙酮酸溶液	0.1	1 mmol/L
XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	0.1	2 mmol/L

安捷伦提供预包被 PDL 的 XFp 细胞培养迷你微孔板（货号 103722-100）和 XFp FluxPak（PDL 板）（货号 103721-100）。这些即用型产品节省了手动包被微孔板的时间与人力，为用户提供了便利性，还减少了常由手动包被过程引起的数据差异。进行 XF Hu T 细胞活化测定时，建议使用这些预包被的迷你微孔板。

与 XFe24 分析仪配套使用

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒（货号 103759-100）是否可与 XFe24 分析仪一起使用尚未经过验证。因此，安捷伦目前不支持将试剂盒与 XFe24 分析仪一起使用。

常见问题解答

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒可用于非人 T 细胞吗？ 不能。该试剂盒仅适用于人原代 T 细胞或人 T 细胞系。

XF Hu T 细胞活化测定试剂盒附带的活化剂是什么？ 活化剂包括溶于 PBS 的可溶性 ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂 (STEMCELL Technologies, Inc.)，不含牛血清白蛋白 (BSA)。ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂是一种四聚体抗体偶联物，其可以结合 CD3 和 CD28 细胞表面配体并刺激 T 细胞活化。它是一种即用型试剂，与 Seahorse XF 探针板上专门设计的加药口兼容，可缩短分析的准备时间，提高分析可靠性。

我可以不同分析类型的分析培养基进行 XF T 细胞活化测定吗？ 已使用补充了 10 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 丙酮酸和 2 mmol/L 谷氨酰胺（货号分别为 103577-100、103578-100 和 103579-100）的 XF RPMI 培养基（pH 7.4，货号 103576-100）对 XF T 细胞活化测定进行了验证和优化。如果使用其他类型的培养基或改变补充剂浓度，则可能会改变 PER 响应，并且可能需要进行活化剂滴定分析。

我需要进行细胞接种密度优化实验吗？如何进行？ 是。当您首次进行 XF T 细胞活化测定时，我们建议进行相应实验（例如，使用显微镜对单层细胞进行评估）以优化细胞接种密度。第 17 页表 4 中建议的接种密度仅作为参考，您应该使用多个高于和低于推荐数量的接种密度进行优化实验。这是因为不同用户或不同实验室使用的细胞计数方法不同，可能产生不同的计数结果，导致 XF 细胞培养微孔板上的接种密度不理想。如果细胞密度低于最佳值，则可能会降低活化信号水平或产生无法解析的数据。相反，如果孔中细胞过多，则一些细胞不能附着在孔底部，在加入活化剂时会被冲到一边，导致分析结果的孔间差异较大。一般来说，离心后，细胞应以单层形式均匀分布在孔板底部，细胞之间有一定的空隙（见下面的图 7）。离心步骤后，最佳细胞密度应显示类似于图 7A 的细胞分布或略高，并且不应超过图 7B 所示的密度。

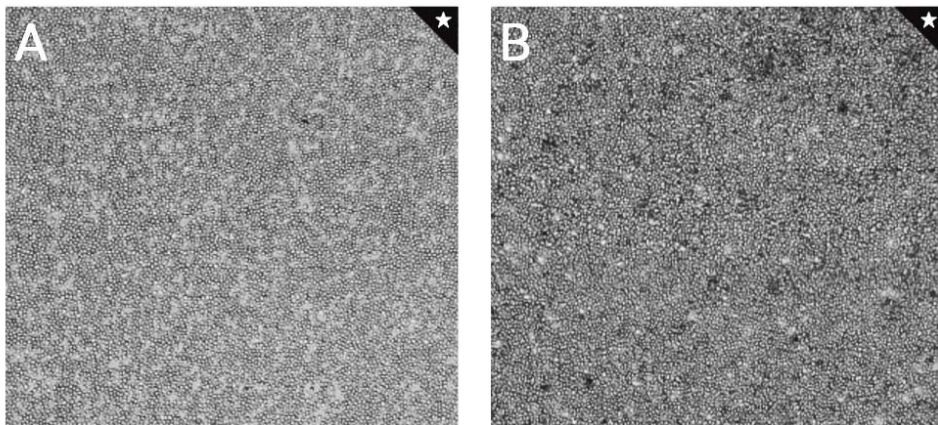


图 7. 最佳细胞接种密度示例的微观视图
A) 图显示最佳细胞密度下限
B) 图显示最佳接种密度上限

每种条件下推荐进行多少次测量，我可以改变分析的时长吗？ 通常，在第一次加入试剂之前建议进行 3 次基础测量以获得可靠的基础速率，在加入 2-DG 并等待 6 分钟后，建议进行 4 次测量。加入 T 细胞活化剂后的测量持续时间通常为 1 小时或 10 次测量，也可以根据实验需要延长至 3 小时。根据实验需要，加入调节剂后的测量持续时间从 30 分钟到 1 小时不等。

使用 XF Hu T 细胞活化测定试剂盒测定 T 细胞活化潜力时，预期结果是什么？ T 细胞活化潜力由基础 PER 信号和最大 PER 信号决定，并且根据细胞类型不同而不同。**表 8** 提供了不同细胞类型的典型 PER 水平汇总，以供参考。其他因素也可能影响 T 细胞活化潜力，如供体、收集过程中细胞的处理方式以及储存条件（见下一个问题）。

表 8 不同类型 T 细胞的典型质子释放率 (PER)

	T 初始	T 效应	T 记忆	Jurket 细胞
基础信号范围 (PER, pmol/min)	20–40	100–200	30–60	500–1000
活化潜力 (PER, pmol/min)	50–120 (200%–300%)	120–250 (20%–40%)	60–200 (200%–300%)	600–1200 (20%–40%)

如果我的细胞没有反应，该怎么办？ 根据供体、收集期间细胞的处理方式以及储存条件的不同，活化潜力也会不同。建议使用反应性细胞作为阳性对照以确保分析正常进行。如果阳性对照显示出良好的反应，但测试细胞未显示任何反应，建议重新查看细胞收集程序或储存条件。可以使用正交功能方法（如细胞因子生成）确认细胞的活化潜力。

我无法访问安捷伦 Seahorse Analytics，我该做些什么？ 如果您使用 Seahorse Analytics 时遇到任何问题，请联系[安捷伦细胞分析支持团队](#)报告您的问题。同时请仔细检查您的网络连接。为了排除与网络浏览器相关的任何问题，建议使用 Chrome、Safari、Firefox 和 Edge 运行 Seahorse Analytics。对于使用 Seahorse Analytics 进行数据分析时遇到的任何其他问题，您可以将数据导出到 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism，以量化最大响应和曲线下面积数据并绘图。有关如何计算分析参数的更多信息，请参阅安捷伦应用简报：[使用 Seahorse XFe96 分析仪通过实时测量糖酵解来调节和检测人 T 细胞活化](#)。

此页有意留为空白。

www.agilent.com

DE.346087963

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
第一版，2020年5月

仅限研究使用。不可用于诊断目的。



5994-1811ZHCN 修订版 A0

