

安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒

用户指南

试剂盒 103595-100

仅限用于安捷伦 Seahorse XF Pro 细胞外流量分析仪。

不建议用于其他安捷伦 Seahorse XF 分析仪。

声明

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022

根据美国和国际版权法，未经 Agilent Technologies, Inc. 事先同意和书面许可，不得以任何形式、任何方式（包括存储为电子版、修改或翻译成外文）复制本手册的任何部分。

手册部件号

5994-3715ZHCN A0 版

版本

第一版，2022 年 4 月

中国出版

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Boulevard
Santa Clara, CA 95051



制造商：
Agilent Technologies, Inc.
300 Griffith Rd,
Chicopee, MA 01022

担保

本文档所含资料“按原样”提供，在以后的版本中若有更改，恕不另行通知。此外，在适用法律许可的最大范围内，**Agilent** 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。对于因提供、使用或执行本手册或此处包含的任何信息而产生的错误，或造成的偶然或必然的损失，**Agilent** 不承担任何责任。如果 **Agilent** 与用户签订了单独的书面协议，其中涉及本文档内容的担保条款与这些条款冲突，则以协议中的担保条款为准。

技术许可

本文档中所述的硬件和/或软件是根据许可提供的，只能根据此类许可的条款进行使用或复制。

限制性权利的说明

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的那些权利。安捷伦根据 FAR 12.211（技术数据）和 12.212（计算机软件）和（对于国防部）DFARS 252.227-7015（技术数据—商品）以及 DFARS 227.7202-3（商业计算机软件或计算机软件文档中的权利）来提供软件和技术数据方面的此常规商业许可。

安全声明

小心

小心提示表示有危害。提醒您注意某个操作步骤、某项操作或类似问题，如果执行不当或未遵照提示操作，可能会损坏产品或丢失重要数据。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。提醒您注意某个操作步骤、某项操作或类似问题，如果执行不当或未遵照提示操作，可能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	5
	术语表	7
	参考文献	8
2	试剂盒信息	
	试剂盒内容物	9
	试剂盒的运输和储存	9
	所需的其他产品	10
3	分析前的优化要求	
4	分析模板的设计和创建	
	创建用于少量化合物测试的模板	14
	定义加药策略、检测液和细胞类型	14
	定义实验组和孔板布局	17
	定义仪器方案	21
	创建用于大量化合物测试的模板	23
	创建用于剂量反应分析的模板	26
	定义加药策略、检测液和细胞类型	26
	定义实验组和孔板布局	26
	定义仪器方案	31
	上传分析模板	32
5	实验流程	
	实验前 1 天（第 1 天）	34
	准备探针板	34
	在 XF Pro M 细胞培养板中接种贴壁细胞	34
	设计/创建并上传分析模板	35
	实验当天（第 2 天）	36
	配制检测液	36
	准备测试化合物、溶剂和鱼藤酮/抗霉素 A 溶液	36
	使用贴壁细胞准备细胞板，并与测试化合物预孵育	37
	准备加药溶液并上样至加药口	37
	进行线粒体毒性检测	38
	数据分析	40
6	XF 线粒体毒性检测：替代工作流程	
7	常见问题解答	

此页有意留为空白。

实验背景 5

术语表 7

参考文献 8

实验背景

安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测是一种定制工作流程，用于在药物发现中识别具有线粒体毒性的化合物，从而降低药物管线中的风险。使用该试剂盒开发的方法是基于药物诱导的毒性导致的线粒体功能障碍会影响线粒体呼吸（耗氧率或 OCR，图 1）这一原理。基于 OCR 的方法（如安捷伦 Seahorse 细胞线粒体压力测试）之前已用于评估线粒体毒性，并被认为是评估药物诱导的线粒体毒性的信息更丰富、更具灵敏性和特异性的方法^[1,2,3]。然而，由于缺乏标准检测方案或数据分析工具，限制了该方法的广泛应用。

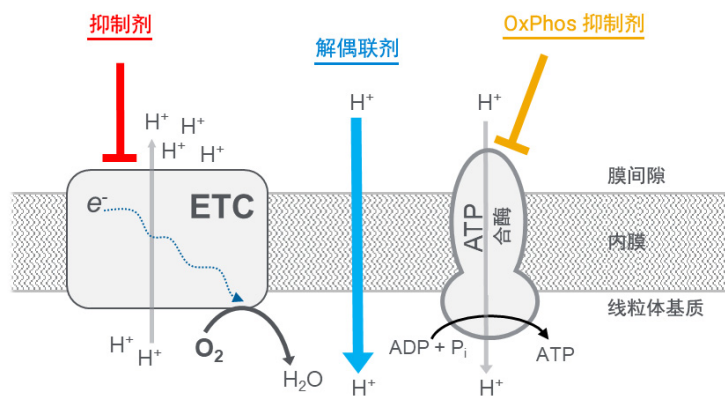


图 1. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测确定的线粒体毒性模式。对转运、三羧酸 (TCA) 循环、脂肪酸氧化、电子传递链 (ETC) 产生影响的化合物，或导致 FCCP OCR 降低的其他上游过程被归类为抑制剂。作为质子载体，将 ETC 与氧化磷酸化 (OxPhos) 机制解偶联，并导致 Oligo OCR 增加的化合物被归类为解偶联剂。对 OxPhos 机制（ATP 合酶、腺嘌呤核苷酸转运蛋白、无机磷酸盐转运蛋白）产生特异性抑制的化合物被归类为 OPI

XF 线粒体毒性检测是由 XF 细胞线粒体压力测试修改而来，压力测试是研究线粒体功能和功能障碍的基本实验。这一改进的检测方法包括寡霉素和 FCCP 的连续加药，同时另一个单独的实验组使用鱼藤酮/抗霉素 A (rot/AA) 做预处理作为实验对照（图 2）。分析完成后，动力学 OCR 信号被转换为一个定制参数，即线粒体毒性指数 (MTI)，用来确定线粒体毒性的模式，并量化毒性程度。

与溶剂组 (MTI = 0) 相比, 导致 FCCP OCR 降低的测试化合物被归类为抑制剂 (图 2A)。Rot/AA 组的 FCCP OCR 作为抑制的阳性对照 (MTI = -1)。经计算, 图 2A 中示例的抑制剂的 MTI 为 -0.8。相反, 与溶剂组 (MTI = 0) 相比, 引起 Oligo OCR 增加的测试化合物被归类为解偶联剂 (图 2B)。溶剂组的 FCCP OCR 作为解偶联的阳性对照 (MTI = 1)。经计算, 图 2B 中示例的解偶联剂的 MTI 为 0.6。

此外, 与溶剂组相比, 导致基础 OCR 降低但对 FCCP OCR 影响较小的测试化合物被归类为 OxPhos 抑制剂 (图 2C)。请注意, 没有为 OPI 计算 MTI 值。

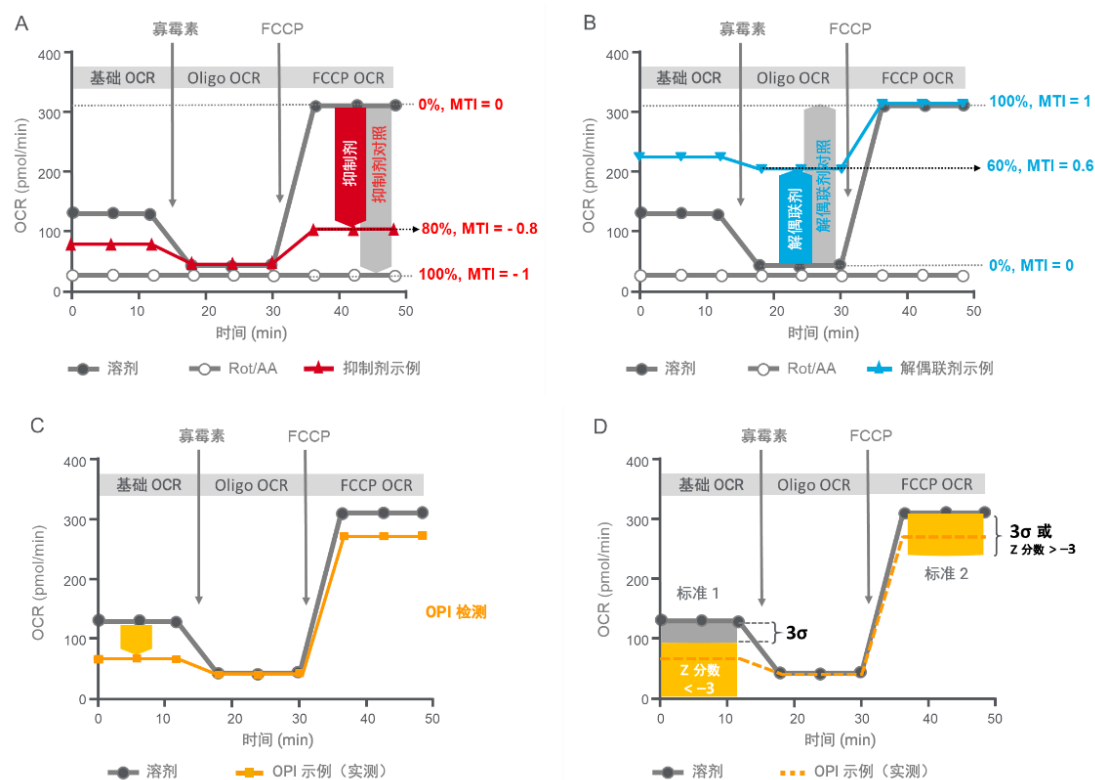


图 2. 对照组 (溶剂和 Rot/AA) 的 Seahorse XF 线粒体毒性检测动力学曲线以及寡霉素和 FCCP 加药示例, 显示了用于评估线粒体毒性模式和毒性程度的呼吸测量结果。A) 定义抑制的 MTI。B) 定义解偶联的 MTI。C) 定义 OxPhos 抑制剂 (OPI)。D) OPI 检测标准

该分析设计可以提供可靠的检测窗口来进行检测 ($Z' > 0.5$), 确保在考察治疗化合物的线粒体毒性的筛选实验或剂量反应实验中, 可以实现可靠的数据解析。有关分析策略、检测定义、参数计算和应用的详细信息, 请参阅 Rogers 等人^[4]撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5]撰写的安捷伦应用简报。

第 7 页图 3 介绍了开展 XF 线粒体毒性检测时可能采用的 3 种工作流程。除了向细胞中加入测试化合物的步骤有所不同, 所有其他流程都是相同的。建议从工作流程 B (预孵育) 开始, 在该工作流程中, 当细胞培养基更换为 XF 检测液时, 向细胞中加入测试化合物。该工作流程通常操作更简单, 同时可以提供关于线粒体毒性化合物的全面的定量信息。

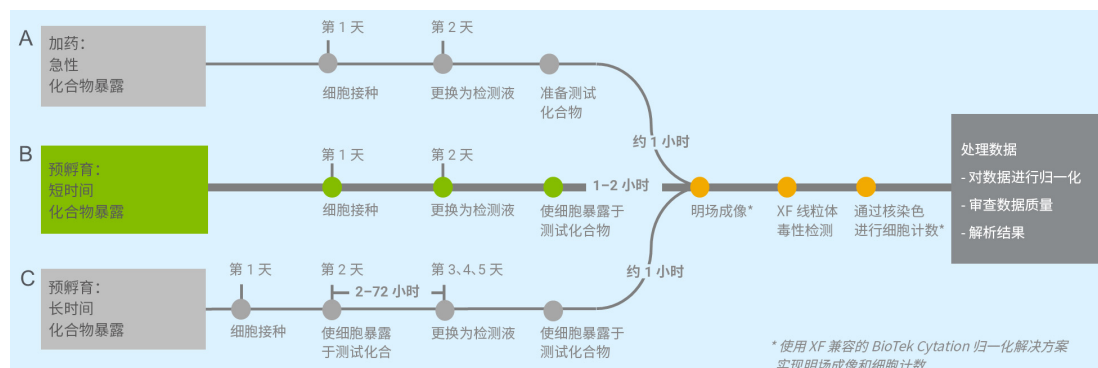


图 3. XF 线粒体毒性检测的简化工作流程，用于研究短期和长期化合物影响。请注意，建议在检测后进行细胞计数以用于归一化（但仅为可选操作），以消除细胞铺板或生长不均匀造成的影响

本用户指南详细说明了如何设计并进行 XF 线粒体毒性检测，并为数据分析提供了初始信息。

术语表

- **电子传递链 (ETC)**: 通过氧化还原反应将电子从电子供体转移到电子受体的一系列线粒体内膜蛋白质复合体（包括 CI 到 CIV）。来自这些氧化还原反应的能量产生一个电化学质子梯度，通过氧化磷酸化机制驱动三磷酸腺苷 (ATP) 的合成
- **氧化磷酸化机制**: 参与三磷酸腺苷 (ATP) 产生的线粒体蛋白质复合体，包括 ATP 合酶（复合体 V）、腺嘌呤核苷酸转运蛋白 (ANT) 和无机磷酸盐转运蛋白 (P_i T)。氧化磷酸化机制通过驱动 ATP 合酶的质子梯度与 ETC 偶联
- **OCR**: 耗氧率
- **基础 OCR**: 加入寡霉素前测得的耗氧率
- **Oligo OCR**: 加入寡霉素后，且加入 FCCP 前测得的耗氧率
- **FCCP OCR**: 加入 FCCP 后测得的耗氧率
- **溶剂对照组**: 使用与测试化合物相同的溶剂（例如 DMSO）且在相同的最终浓度下处理的一组孔
- **Rot/AA 对照组**: 在分析前的预处理步骤中加入鱼藤酮/抗霉素 A 的一组孔
- **线粒体毒性指数 (MTI)**: 一个用于定性和定量线粒体毒性的参数。MTI 正值（通常在 0 到 1 之间）表明是由解偶联引起的线粒体毒性。MTI 负值（通常在 0 到 -1 之间）表明是由抑制作用引起的线粒体毒性。有关 MTI 的更多信息，请参阅 Rogers 等人^[4] 撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5] 撰写的安捷伦应用简报
- **抑制剂**: 导致 FCCP OCR 降低的化合物（与溶剂组的最大 FCCP OCR 相比），典型的 MTI 值范围为 0 至 -1

- **解偶联剂**: 导致 Oligo OCR 增加的化合物 (与溶剂对照组的最小 Oligo OCR 相比), 典型的 MTI 值范围为 0 至 1
- **OxPhos 抑制剂 (OPI)**: 与溶剂对照组的基础 OCR 相比, 导致基础 OCR 显著降低, 但与溶剂对照组的 FCCP OCR 相比, 并未对 FCCP OCR 造成显著影响的化合物
- **短期 XF 线粒体毒性检测工作流程** 用于评估测试化合物对线粒体功能的短期影响。在进行 XF 分析前 1-2 小时向细胞中加入测试化合物。这是推荐的标准方案
- **急性 XF 线粒体毒性检测工作流程**: 用于评估加入测试化合物后几分钟内线粒体功能的任何实时变化。在进行基础 OCR 测量之后, 且在加入寡霉素之前, 通过加药口 A 将测试化合物加入细胞中
- **长期 XF 线粒体毒性检测工作流程** 用于评估测试化合物对线粒体功能的长期影响。在进行 XF 分析之前, 通常将测试化合物与细胞孵育 4-72 小时
- **急性响应**: 在进行基础 OCR 测量后, 且加入寡霉素之前, 由于加入测试化合物而引起的 OCR 变化
- **Z' 因子 (Z')**: Z' 值是一种用于评估检测质量或检测性能的指标, 并受所获得的检测数据的动态范围和标准误差的影响。Z' 因子可用于解偶联和抑制作用结果, 以便评估检测性能。关于 Z' 值的更多信息, 请参阅 Rogers 等人^[4] 撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5] 撰写的安捷伦应用简报

参考文献

- 1 Will et al. Nat Protoc. **2006**, 1(6), 2563–2572. DOI: [10.1038/nprot.2006.351](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.351)
- 2 Will Y and Dykens J. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. **2014**, 10:8, 1061. 1067 DOI:[10.1517/17425255.2014.939628](https://doi.org/10.1517/17425255.2014.939628)
- 3 Tilmant et al. *Toxicol in Vitro*. **2018**, 52, 374–383. DOI:[10.1016/j.tiv.2018.07.012](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.012)
- 4 Rogers 等, 使用安捷伦 Seahorse XF 解决方案开展线粒体毒性评估的原则, *安捷伦科技公司白皮书*, 出版号 5994-4732ZHCN
- 5 Kam 等, 用于线粒体毒性检测和表征的定制化 XF 工作流程, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-4778ZHCN

试剂盒内容物	9
试剂盒的运输和储存	9
所需的其他产品	10

试剂盒内容物

安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒包含 6 个铝箔袋，每个铝箔袋包含足够用于一块 96 孔板全板分析的试剂。每个铝箔袋包括以下化合物各一瓶：寡霉素、FCCP 和鱼藤酮/抗霉素 A 混合物（见表 1）。

表 1 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒内容物

化合物	瓶盖颜色	数量
寡霉素	蓝色	63 nmol
FCCP	黄色	72 nmol
鱼藤酮/抗霉素 A (Rot/AA)	红色	各 5.4 nmol

试剂盒的运输和储存

安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒在室温下运输与储存。本产品自生产之日起可稳定保存一年。实际有效期印于试剂盒的标签上。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。

所需的其他产品

进行 Seahorse XF 线粒体毒性检测还需要表 2 中的安捷伦产品，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	货号
安捷伦 Seahorse XF Pro 分析仪	
安捷伦 Seahorse XF Pro M FluxPak， 18 次分析*	103775-100
安捷伦 Seahorse XF Pro M FluxPak， 6 次分析*	103777-100
安捷伦 Seahorse XF Pro M 细胞培养板， 6 块板†	103774-100
安捷伦 Seahorse XF DMEM 培养基 pH 7.4‡	103575-100
安捷伦 Seahorse XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	103577-100
安捷伦 Seahorse XF 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液	103578-100
安捷伦 Seahorse XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	103579-100
安捷伦储液槽， 12 列， 聚丙烯或	201280-100 或
安捷伦储液槽， 12 列， 聚丙烯， 经辐射灭菌	204365-100

* 货号 103775-100 和 103777-100 包含安捷伦 Seahorse XF 探针板和 XF Pro M 细胞培养板

† 货号 103774-100 不包含进行 XF 分析所需的 XF 探针板。只有当需要其他孔板来优化接种密度时才需要这个货号的产品

‡ XF DMEM 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 103680-100）。有关所有培养基类型的完整列表以及我们针对每种检测试剂盒的建议，请参阅《[安捷伦 Seahorse XF 培养基选择指南](#)》

分析前的优化要求

获得可靠结果的最佳化合物浓度与细胞系有关。因此，建议在进行 XF 线粒体毒性检测之前，针对每种新细胞类型对试剂盒中提供的化合物进行滴定实验。某些检测条件也会影响最佳化合物浓度，例如在检测液中添加 BSA 或血清。在这种情况下，也需要优化实验条件。

这对 FCCP 至关重要。FCCP 是一种评估细胞最大呼吸能力的常用化合物。当未采用最佳浓度时，将导致检测窗口缩短，从而降低检测性能。在进行 XF 线粒体毒性检测之前，每当使用新的细胞类型或一些新的分析条件时，必须进行 FCCP 优化实验。可以使用安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒进行 FCCP 优化实验。本文件中提供了一个标准方案：*使用安捷伦 Seahorse XF Pro 分析仪进行安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试，对 FCCP 进行优化。*

对于大多数细胞类型，推荐使用 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素，而鱼藤酮/抗霉素 A 推荐使用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。如有任何问题需要帮助，请联系安捷伦[细胞分析技术支持](#)。

细胞接种密度也必须根据所使用的细胞类型进行优化。细胞接种密度优化可与 FCCP 优化实验相结合。HepG2 细胞在 XF Pro M 细胞培养板上的最佳接种密度约为 20×10^3 个细胞/孔。当开始使用 HepG2 细胞时，建议测试以下 3 种接种密度： 10×10^3 、 20×10^3 和 30×10^3 个细胞/孔，以确定最佳接种密度。一般情况下，FCCP 刺激后的 OCR 不应超过 350 pmol/min。如果超过这个数值，就应该降低接种密度。

在进行化合物测试或筛选之前，鼓励在检测验证期间进行检测性能 (Z') 评估。有关 Z' 值计算和示例的更多信息，请参阅 Roger 等人^[4] 撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5] 撰写的安捷伦应用简报。

此页有意留为空白。

创建用于少量化合物测试的模板	14
创建用于大量化合物测试的模板	23
创建用于剂量反应分析的模板	26
上传分析模板	32

本节介绍了创建 XF 线粒体毒性检测模板的步骤。

XF 分析模板提供了对安捷伦 Seahorse XF Pro 分析仪进行设置以采集测量数据和执行加药的仪器方案，必须在进行分析之前创建。同时需要模板中的分析设计信息，用于支持下游安捷伦 Seahorse Analytics 中的数据转换。

对于 XF 线粒体毒性检测，从 **blank**（空白）模板开始创建模板。可以使用安装在台式计算机上的安捷伦 Seahorse XF Pro Controller 或安捷伦 Seahorse XF Wave Pro 软件来设计分析模板。

4 分析模板的设计和创建

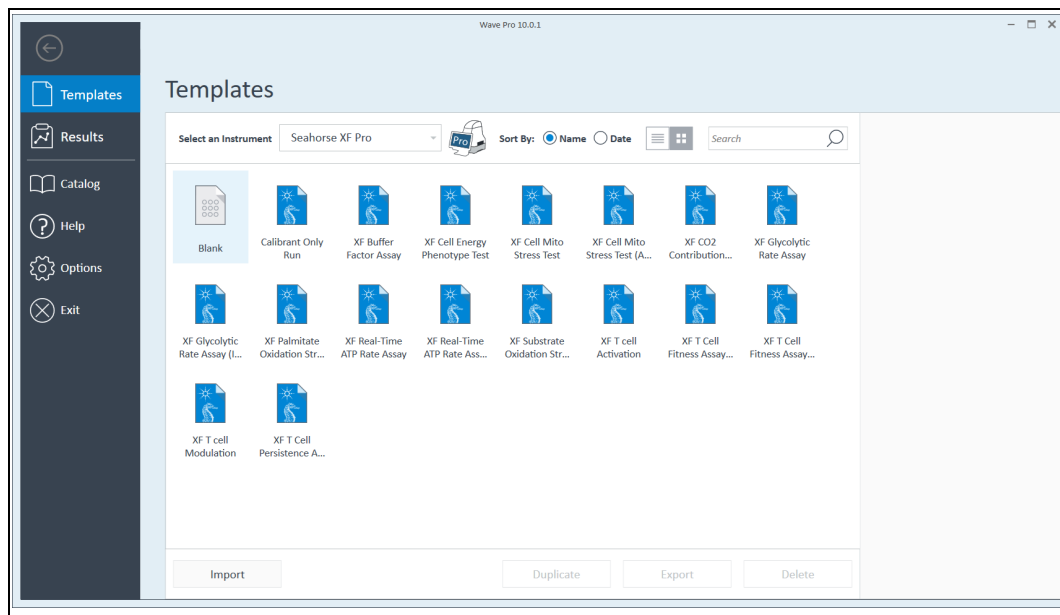
创建用于少量化合物测试的模板

创建用于少量化合物测试的模板

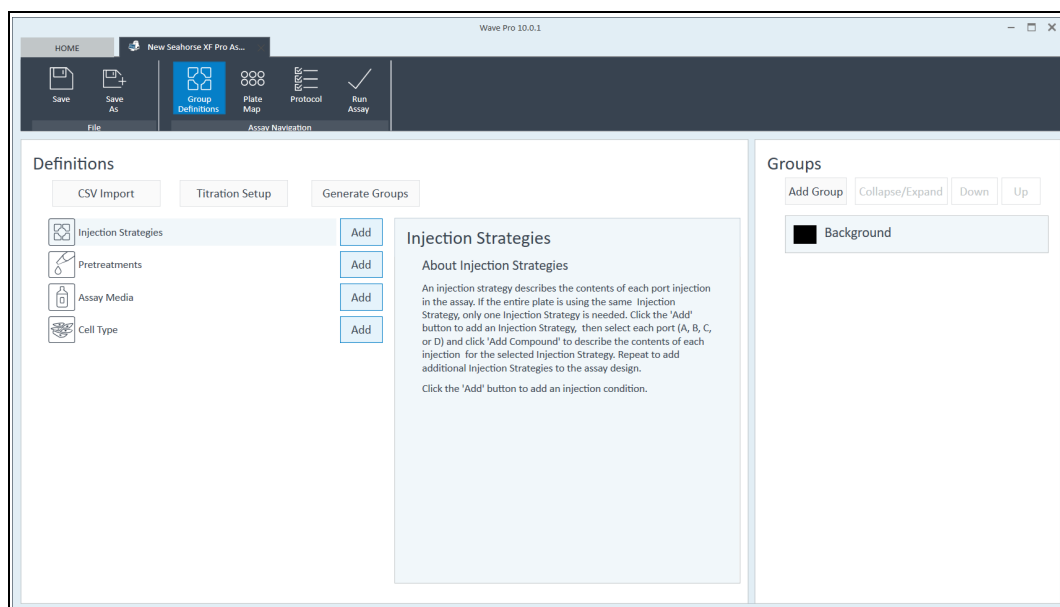
本节中描述的程序旨在用于所测试的化合物数量较少的实验（例如，单剂量下每板 10 个测试化合物）。

定义加药策略、检测液和细胞类型

- 1 打开 Wave Pro 软件。双击空白模板



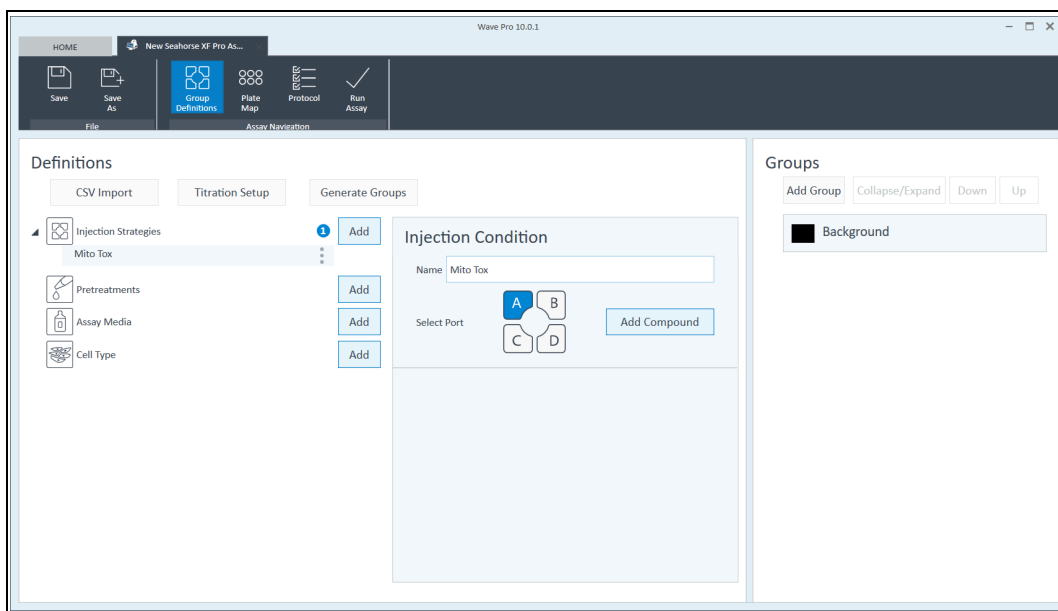
- 2 将出现以下窗口。中间面板中的描述解释了什么是加药策略以及如何添加加药策略



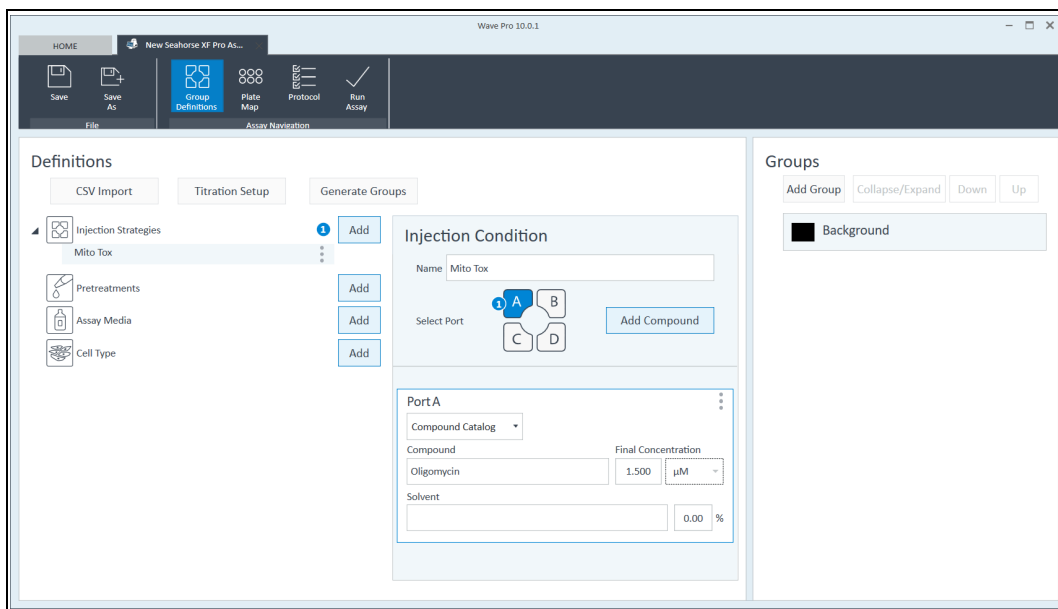
4 分析模板的设计和创建

定义加药策略、检测液和细胞类型

3 单击 **Injection Strategies**（加药策略）框右侧的 **Add**（添加）。中间面板将显示以下信息

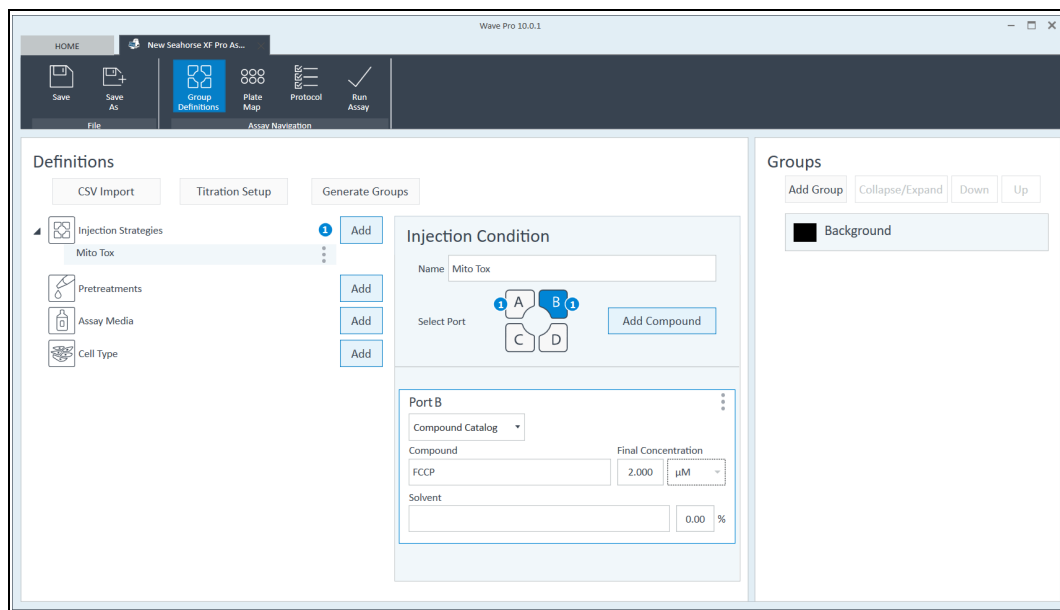


4 在 **Name**（名称）框中输入“Mito Tox”（线粒体毒性）。在为每个加药口分配加药化合物时，首先选择加药口，然后单击 **Add Compound**（添加化合物）。对于加药口 A，输入寡霉素，最终浓度为 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 。对于加药口 B，输入 FCCP 和最终浓度（预先确定的最佳最终浓度，见第 11 页的“分析前的优化要求”）

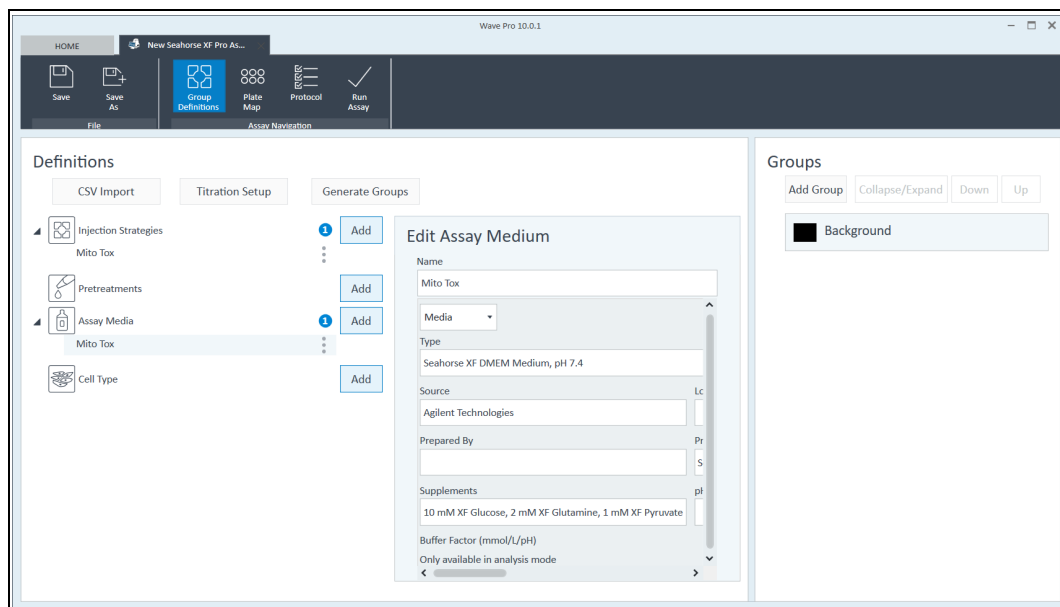


4 分析模板的设计和创建

定义加药策略、检测液和细胞类型



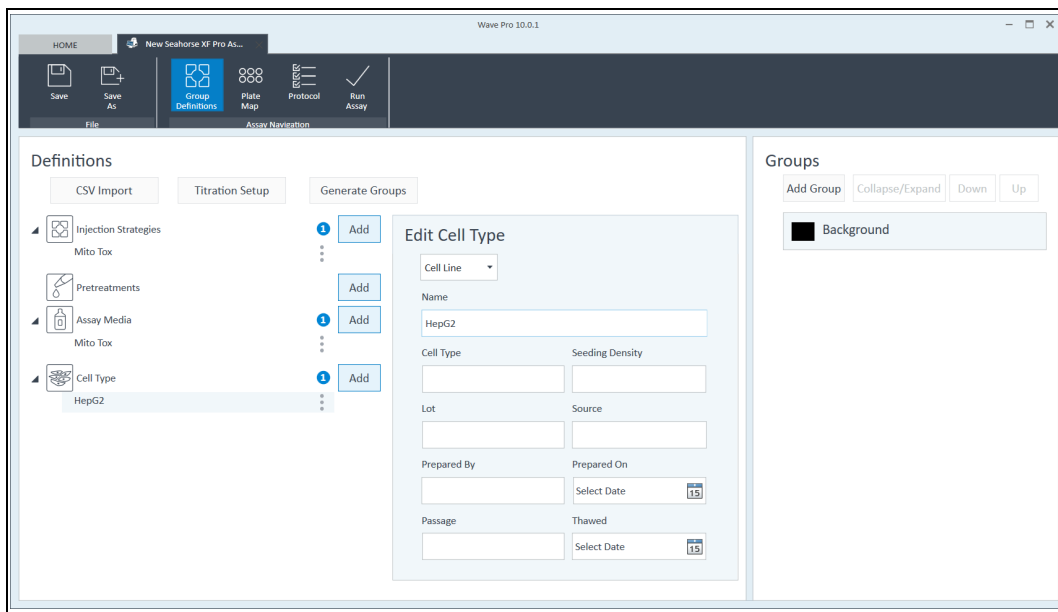
- 5 接下来，定义检测液。单击 **Assay Media**（检测液）框右侧的 **Add**（添加）。输入名称并从 **Media**（检测液）下拉菜单中选择检测液类型（例如，XF DMEM pH 7.4，添加 10 mmol/L XF 葡萄糖、1 mmol/L XF 丙酮酸钠和 2 mmol/L XF 谷氨酰胺）



4 分析模板的设计和创建

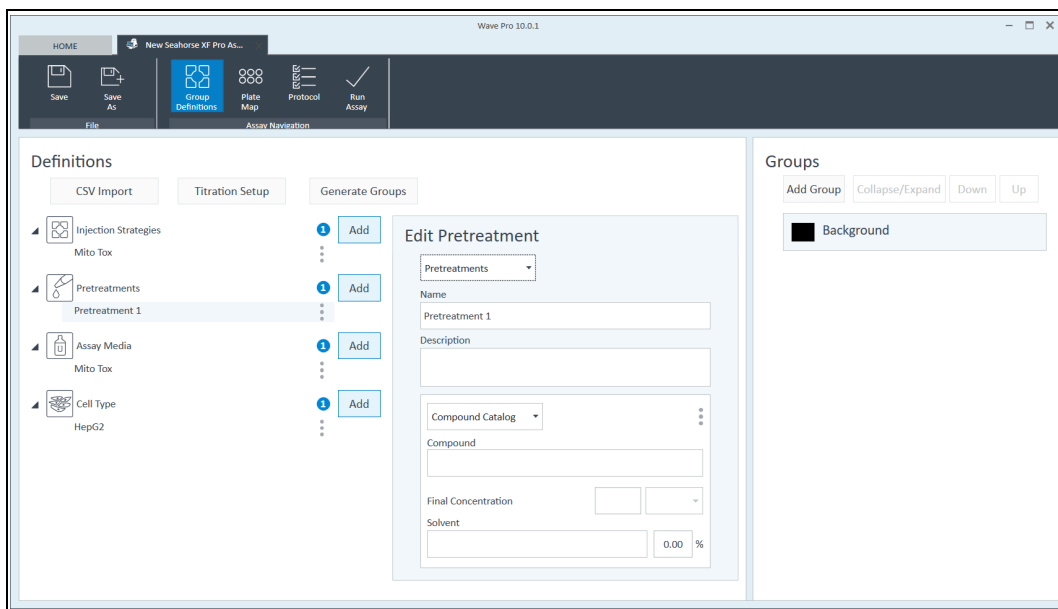
定义实验组和孔板布局

- 6 定义 **Cell Type**（细胞类型），单击 **Cell Type**（细胞类型）框右侧的 **Add**（添加），并输入待分析细胞类型的详细信息



定义实验组和孔板布局

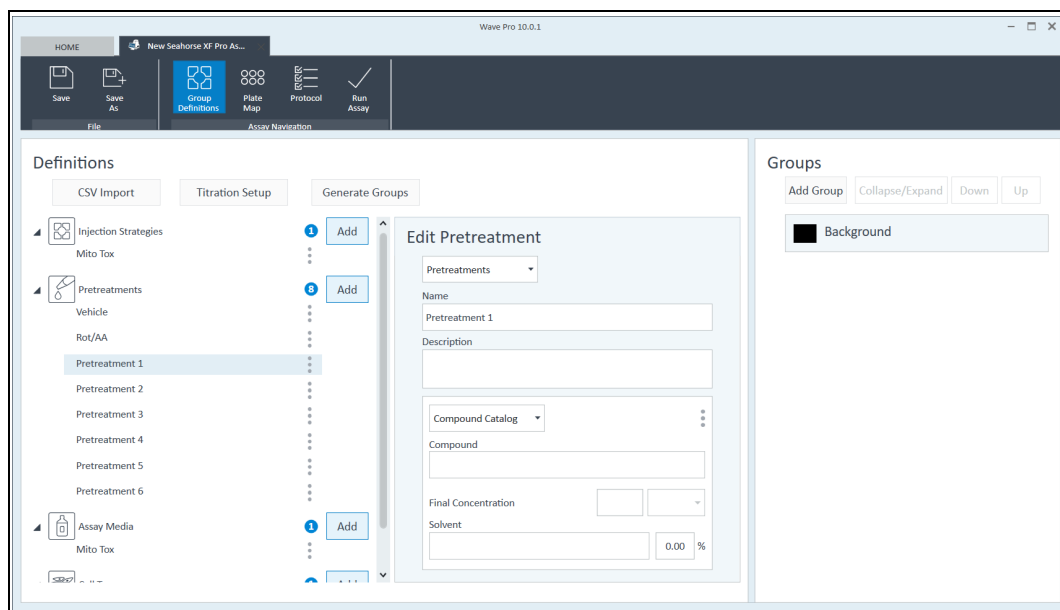
- 1 首先，定义实验组的预处理/条件，单击 **Pretreatments**（预处理）框右侧的 **Add**（添加）



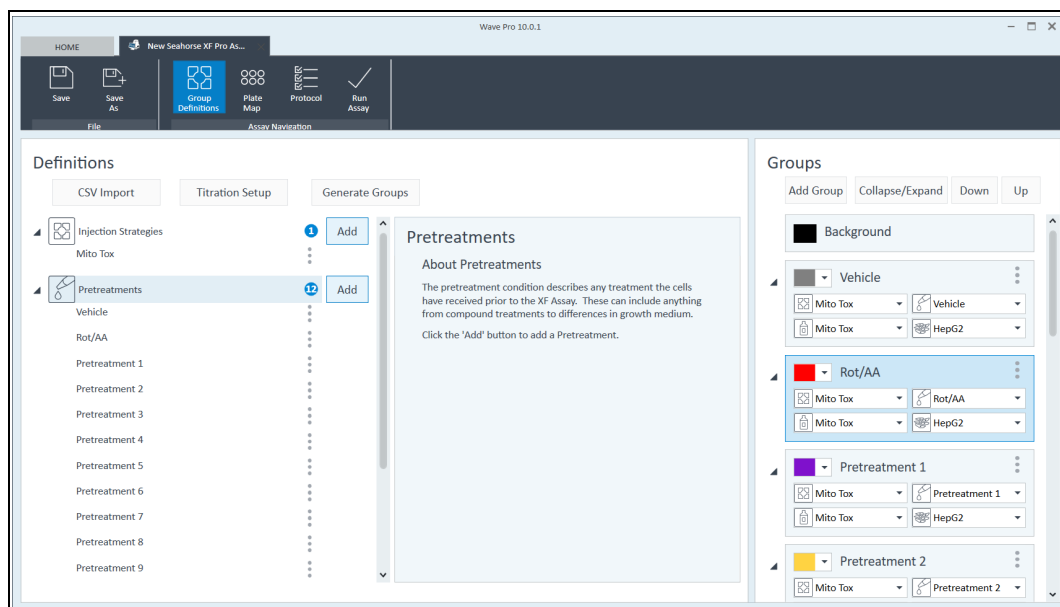
4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

- 2 使用此功能为两个对照组（溶剂组和鱼藤酮/抗霉素 A 组）以及使用测试化合物处理的任何其他实验组创建预处理/条件。可以在中间面板的编辑视图中手动更改处理名称。可以通过单击每个处理右侧的三点式菜单来删除该处理



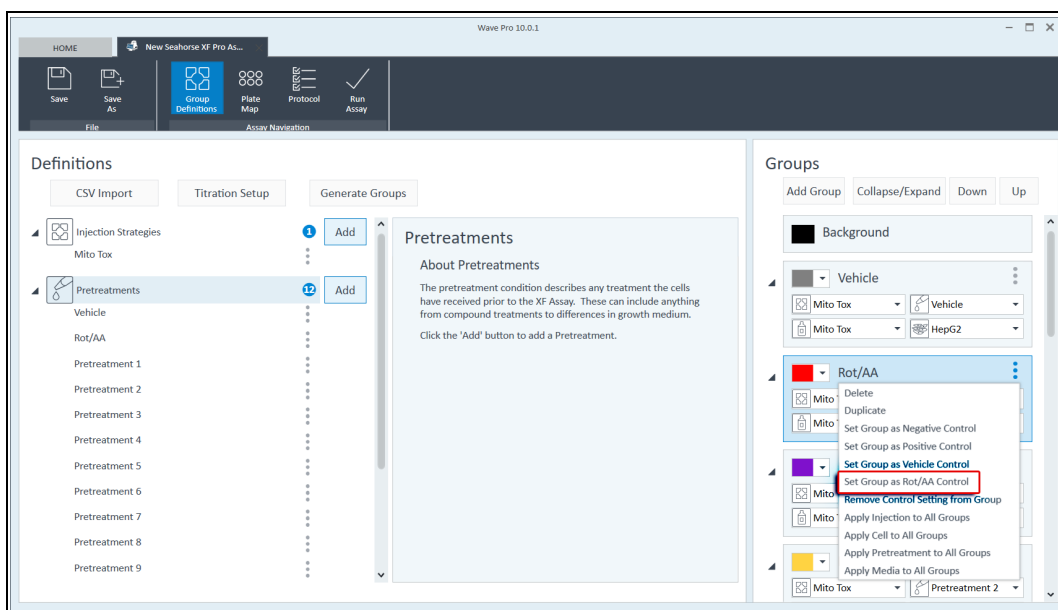
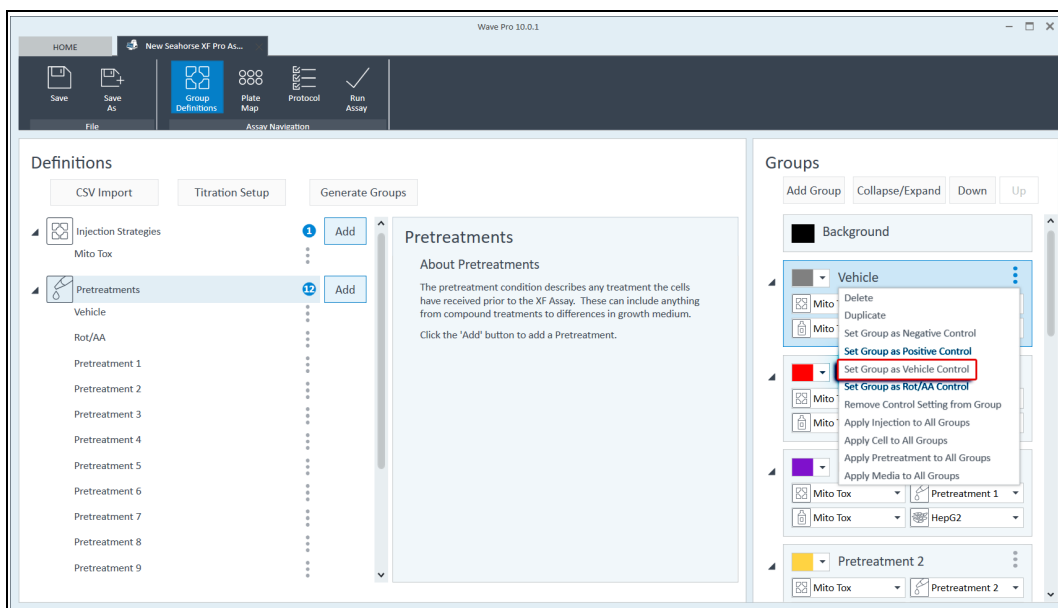
- 3 在所有处理/条件创建完成后，单击窗口顶部 **Definitions**（定义）（**Titration Setup**（滴定设置）旁边）下的 **Generate Groups**（生成组）。成功生成组，每组对应一个预处理/条件。预定义的加药策略、检测液、细胞类型和预处理被自动分配到生成的组（见下方截图中的右侧面板）



4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

- 4 单击溶剂组旁边的三点式菜单，选择 **Set Group as Vehicle Control**（将组设置为溶剂对照组）。如有需要，将颜色更改为灰色。对鱼藤酮/抗霉素 A 组重复此步骤，选择 **Set Group as Rot/AA Control**（将组设置为鱼藤酮/抗霉素 A 对照组），如有需要，将颜色更改为红色



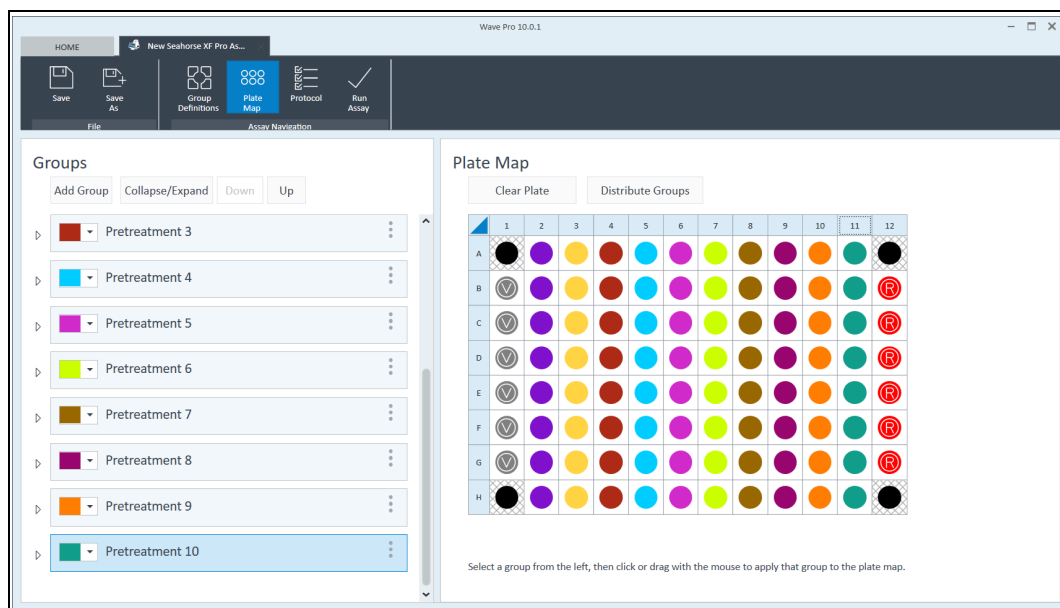
4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

- 5 接下来，切换到 **Plate Map**（孔板分布图）选项卡，并为组分配所需的孔。首先选择/突出显示特定的组（在 **Groups**（组）下），然后在 **Plate Map**（孔板分布图）中单击或拖动鼠标选中要分配的孔

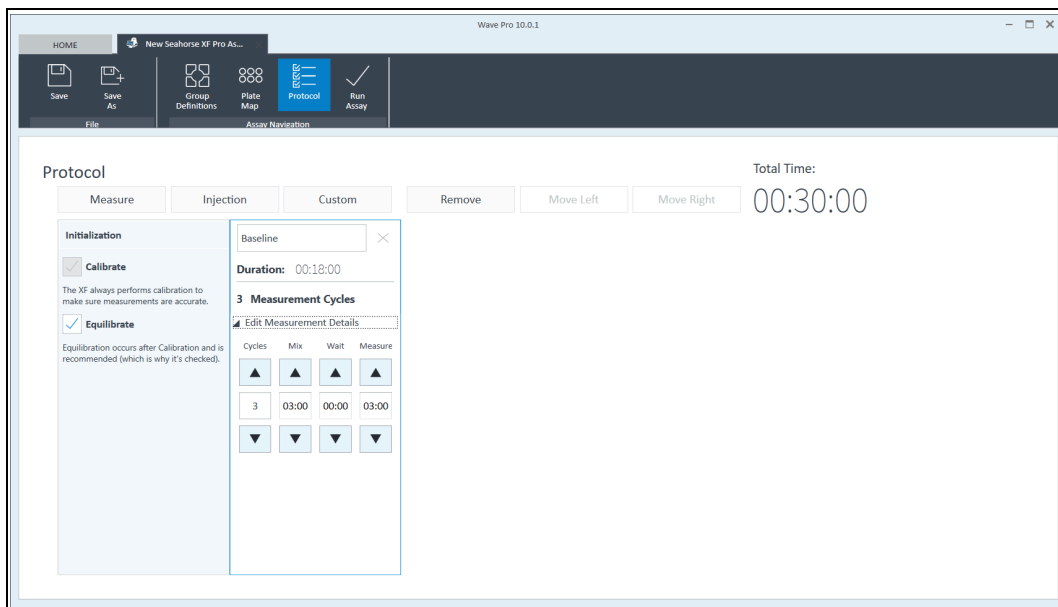
注意

建议将溶剂组放在第 1 列（B 行至 G 行），鱼藤酮/抗霉素 A 组放在第 12 列（B 行至 G 行）。确保正确地分配对照组。溶剂组的孔将显示“V”，鱼藤酮/抗霉素 A 组的孔将显示“R”。如果不设置这些组，则不能计算 MTI 参数。

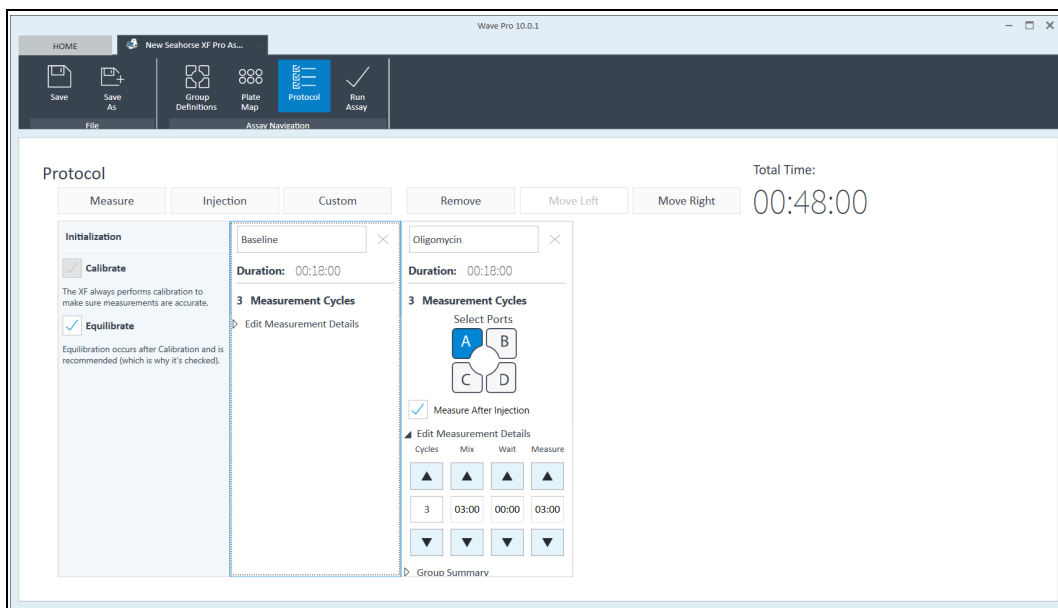


定义仪器方案

- 1 切换至 **Protocol**（方案）选项卡。空白模板采用一个 **Baseline**（基线）步骤构建，它包括 3 个基础测量



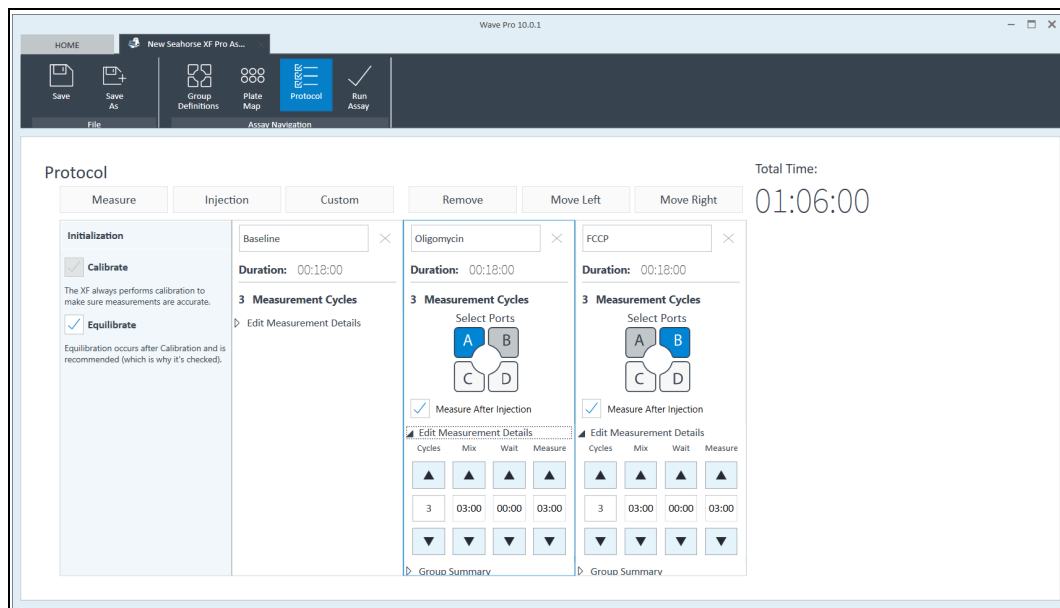
- 2 接下来，通过单击 **Injection**（加药）框添加一个加药步骤。输入寡霉素代替“加药 1”。确保加药口 A 突出显示；这表明将通过加药口 A 加入寡霉素。这一步骤包括加药后的 3 次测量。不建议更改 XF 线粒体毒性检测的测量时间和次数，但如有必要也可以进行更改



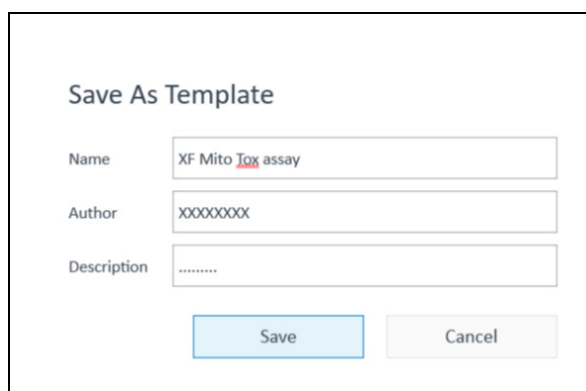
4 分析模板的设计和创建

定义仪器方案

- 再次单击 **Injection**（加药）框添加另一个加药步骤。输入 FCCP 代替“加药 2”。确保加药口 B 突出显示，这表明将通过加药口 B 加入 FCCP。此步骤同样包括加药后的 3 次测量



- 现在已经完成模板创建。单击左上角的 **Save**（保存），为模板命名，然后在对话框中单击 **Save**（保存）



注意

可以按照本节中提供的说明创建用于 Z' 值评估的模板。有关 Z' 值评估方法的更多信息，请参阅 Rogers 等人^[4]撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5]撰写的安捷伦应用简报。

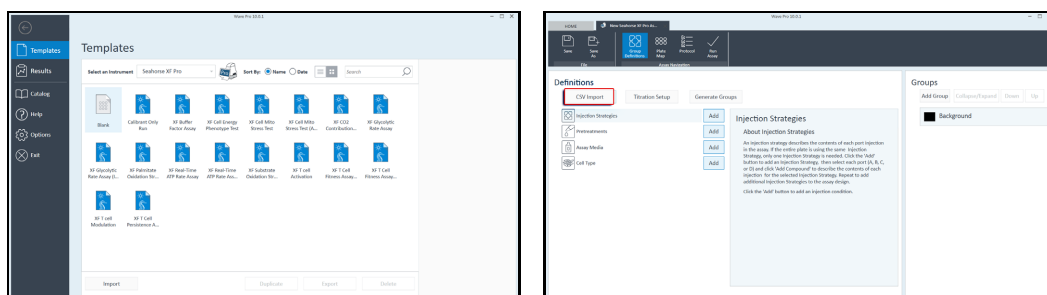
4 分析模板的设计和创建

创建用于大量化合物测试的模板

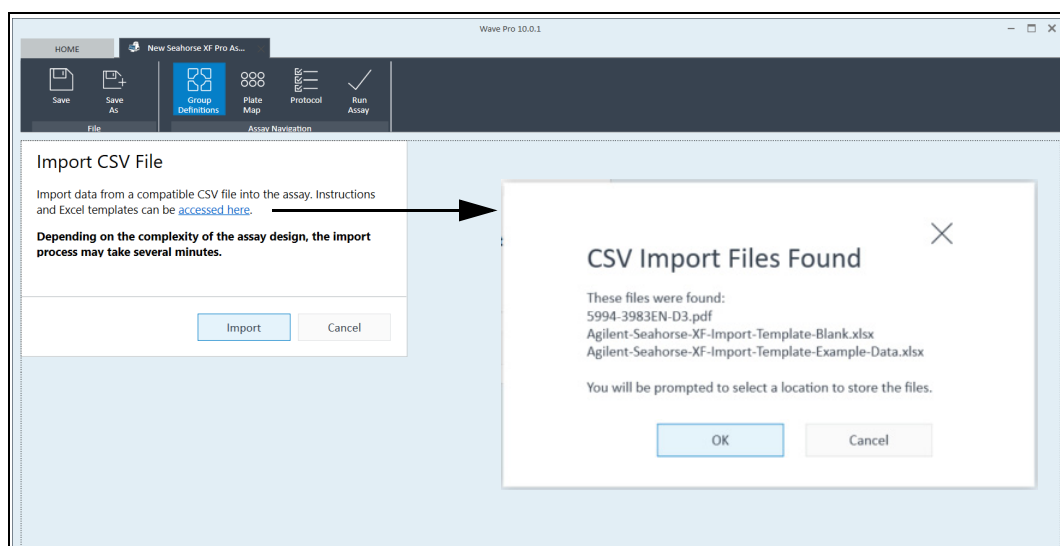
创建用于大量化合物测试的模板

本节中描述的程序旨在用于所测试的化合物数量较多的筛选实验（例如，单剂量下每板 80 个测试化合物）。此时，使用 CSV 导入功能可以大大缩短创建分析模板的时间。CSV 文件中的设计属性包括组定义、加药策略、检测液和细胞类型，以及孔板分布图。

- 1 打开 Wave Pro 软件。双击空白模板。在新视图中，选择 **CVS Import**（CSV 导入）



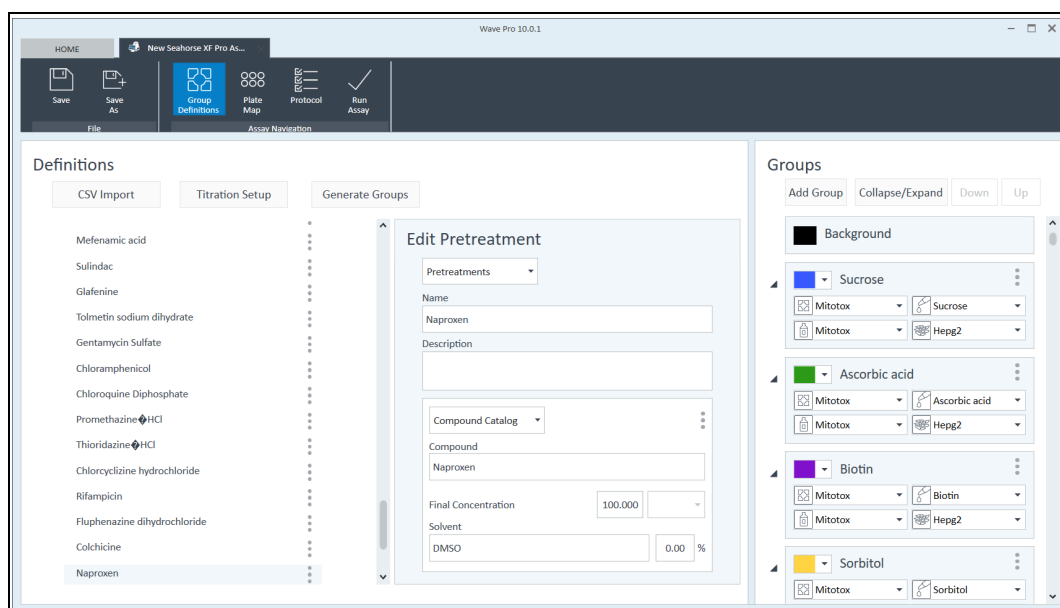
- 2 在下面的视图中，单击链接 (accessed here) 下载 Excel 模板文件。在弹出的对话框中单击 **OK**（确定）。将自动下载关于如何使用此功能，以及如何填写模板的详细说明，以及一个示例文件



创建用于大量化合物测试的模板

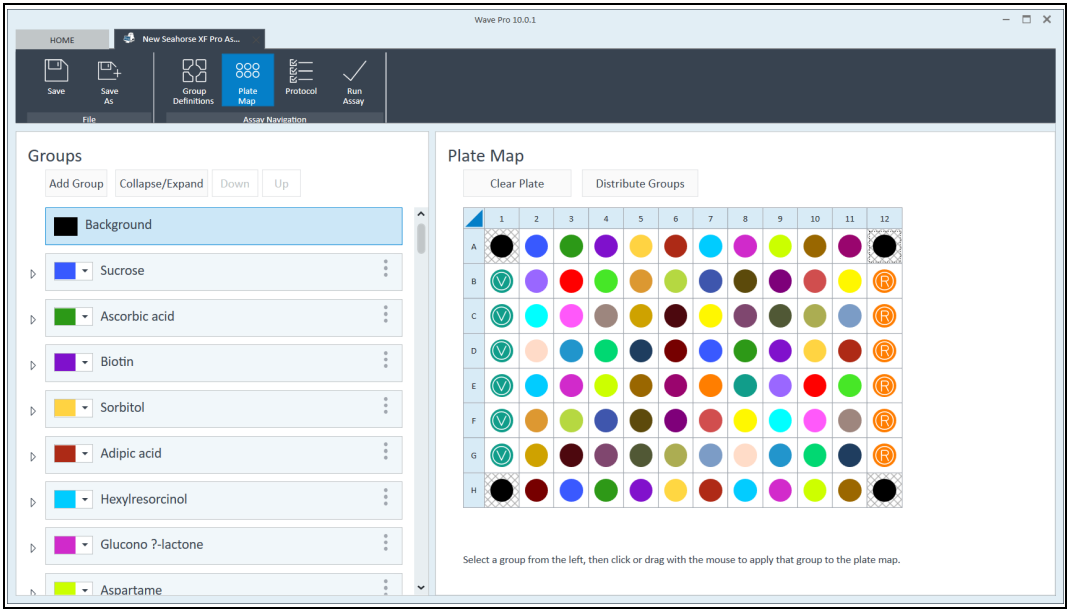
- | Enzo Library Plate 2 Mitox Pretreatment Screen HepG2 - Read Only | | | | | | | | | | | | | | | GAGALICE (Agilent USA) | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|---|------------------------|-----------|----------------------|----------------|-----------|----------|------------|-----------|-----------|-------|----------|------|------------------------|------|-------------|---|-------------|---|-------------|---|--|--|--|--|--|--|--|
| File Home Insert Draw Page Layout Formulas Data Review View Help | | | | | | | | | | | | | | | Share Comments | | | | | | | | | | | | | | |
| S24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | W | | | | | | | |
| 1 | Assay Information | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Project Name | | Principal Investigator | Plated By | Notes | Project Number | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Group Name | | Assay Groups | | Media Condition Data | | Cell Type | | Cell Type | | Cell Type | | Seedling | | Cell Lot | | Cell Source | | Cells Prepi | | Cells Passi | | | | | | | | |
| 4 | Background | | Background A1 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Sucrose | | A2 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Ascorbic acid | | A3 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | Biotin | | A4 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | Sorbitol | | A5 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Adipic acid | | A6 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | Hexyresorcinol | | A7 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | Glucano 7-lactone | | A8 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | Aspartame | | A9 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | Benzoic acid | | A10 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | Propyl gallate | | A11 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | Rot/AA | | Rot/AA | A12 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | |
| 16 | Vehicle | | Vehicle | B1 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | |
| 17 | Tacrine-HCl | | B2 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | Carbamazepine | | B3 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | DMNQ | | B4 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | Phenyltin | | B5 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | Seneciophylline | | B6 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 22 | Chlorozoxazone | | B7 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 23 | Nifedipine | | B8 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 24 | Methylprednisolone | | B9 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | Isoniazid Phosphate | | B10 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF | 7.4 HepG2 | HepG2 | | 20000 | ATCC | 7003 | ATCC | xxx | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | Blank | | Blank | B11 | Mitotox | Seahorse | Agilent | | 10 mM XF</ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

- 4 填写完所需的信息后，将模板保存为 .CSV 格式。关闭文件和 Excel 程序。返回至 Wave Pro 软件
- 5 选择 **Import**（导入）选项，将 CSV 文件加载到 Wave Pro 中。浏览以找到模板并打开它。完成导入可能需要几分钟的时间
- 6 导入完成后，将出现 **Group Definition**（组定义）视图。检查所有的组，包括溶剂和鱼藤酮/抗霉素 A 对照组，确保这些组已进行正确分配。如果没有，滚动组列表并分配对照组



4 分析模板的设计和创建

创建用于大量化合物测试的模板



- 7 切换至 **Protocol**（方案）选项卡。按照第 14 页的“创建用于少量化合物测试的模板”中描述的步骤定义仪器方案
- 8 现在已经完成模板创建。单击左上角的 **Save**（保存），为模板命名，然后在对话框中单击 **Save**（保存）

Save As Template

Name

XF Mito Tox Screening assay

Author

XXXXXXXX

Description

.....

Save

Cancel

创建用于剂量反应分析的模板

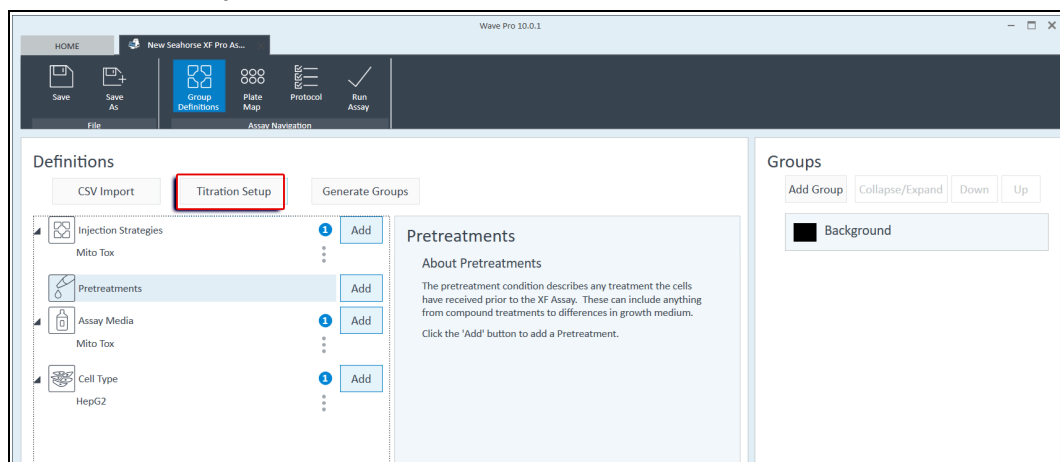
本节中描述的程序旨在用于进行剂量反应分析（例如，每板 8 个测试化合物，每个化合物 10 种剂量）。

定义加药策略、检测液和细胞类型

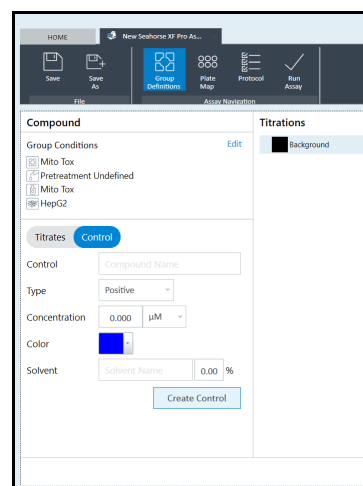
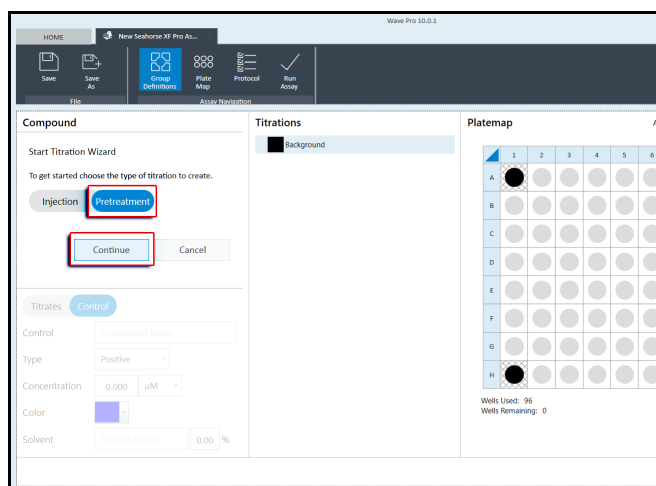
按照第 14 页的“创建用于少量化合物测试的模板”中描述的步骤定义加药策略、检测液和细胞类型，因为整个流程是相同的。应首先定义这些属性，因为当使用 **Titration Setup**（滴定设置）时，它们将自动分配给所有滴定组和对照组。

定义实验组和孔板布局

1 选择 **Titration Setup**（滴定设置）选项卡



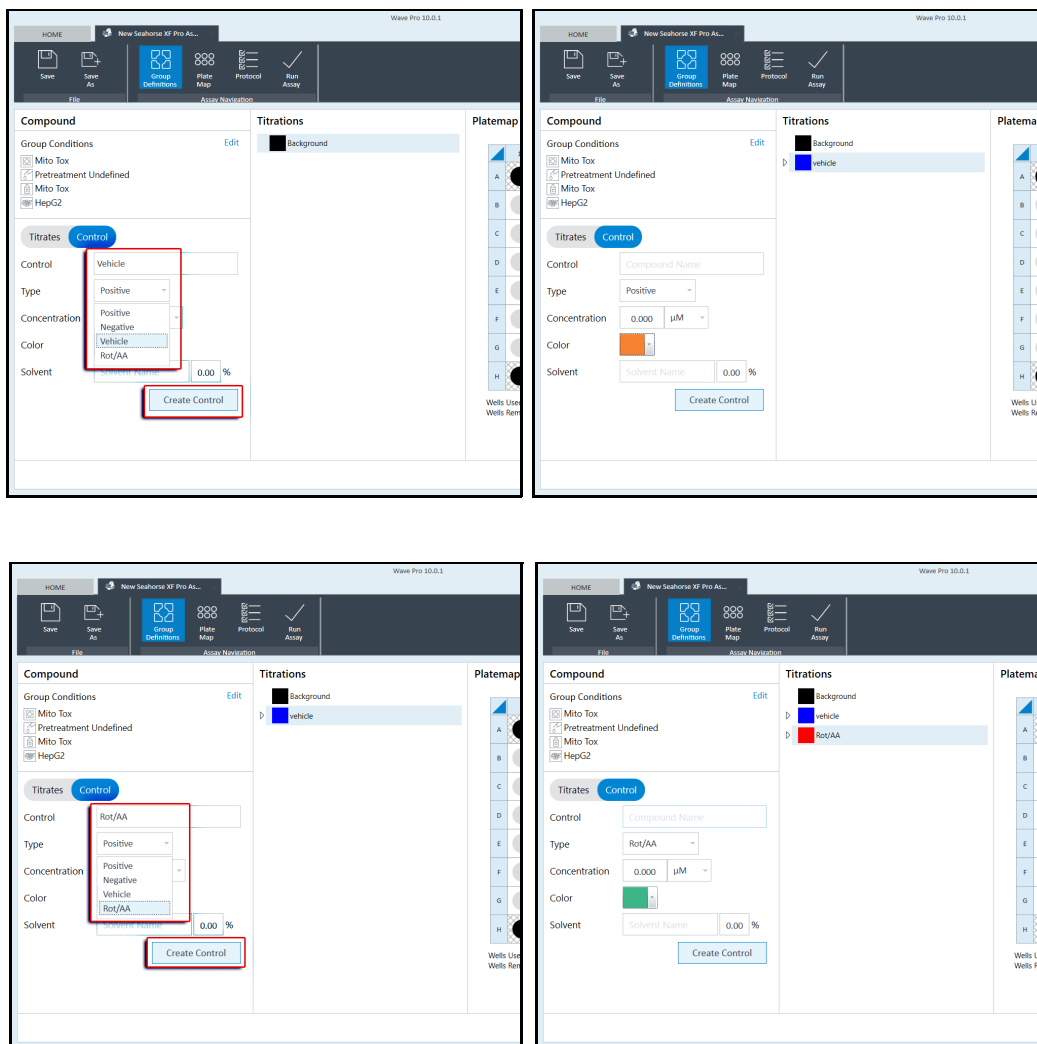
2 对于短期 XF 线粒体毒性检测工作流程，使用默认的 **Pretreatment**（预处理）选项。单击 **Continue**（继续）



4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

3 首先，创建并分配所需的对照组：溶剂组和鱼藤酮/抗霉素 A 组



4 可以在创建后通过双击组名称进行重命名。如需删除某个组，双击组名称，然后点击右边的叉号

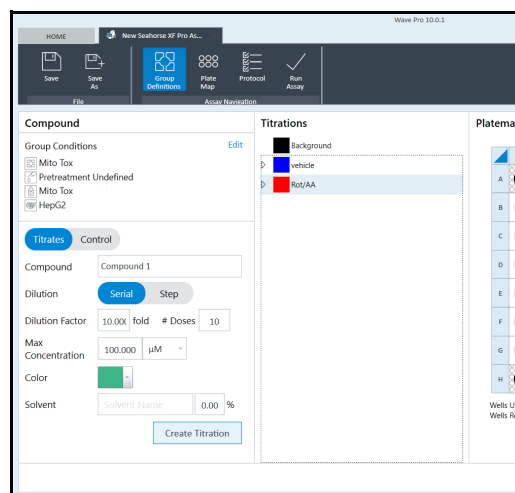
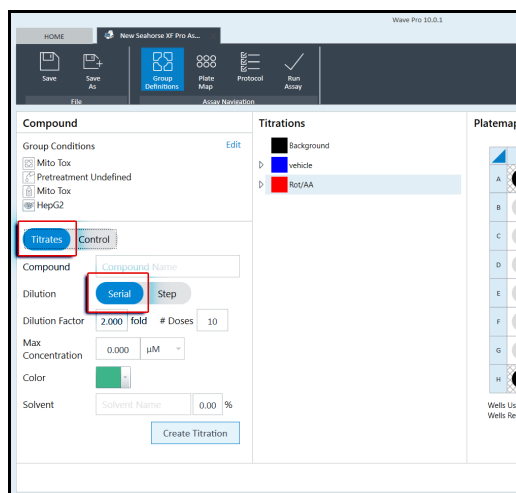
注意

视图底部的 **Delete All**（全部删除）功能用于删除创建的所有内容。它还将删除上一节定义的 **Group Conditions**（组条件）。

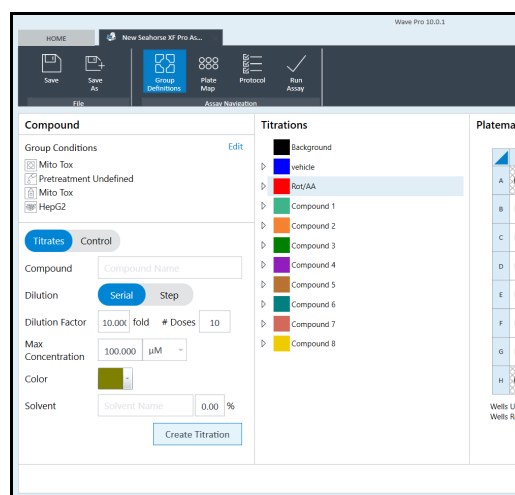
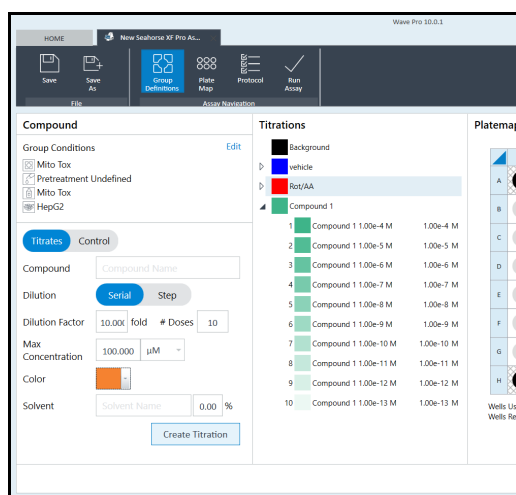
4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

- 5 创建对照组之后，切换至 **Titration**（滴定）视图。选择 **Serial**（连续）或 **Step**（步骤）开始创建滴定系列。输入化合物名称、稀释倍数和最大浓度。然后单击 **Create Titration**（创建滴定）。生成该化合物的连续稀释。确保此时分配了正确的浓度和单位，因为稍后将无法对它们进行编辑



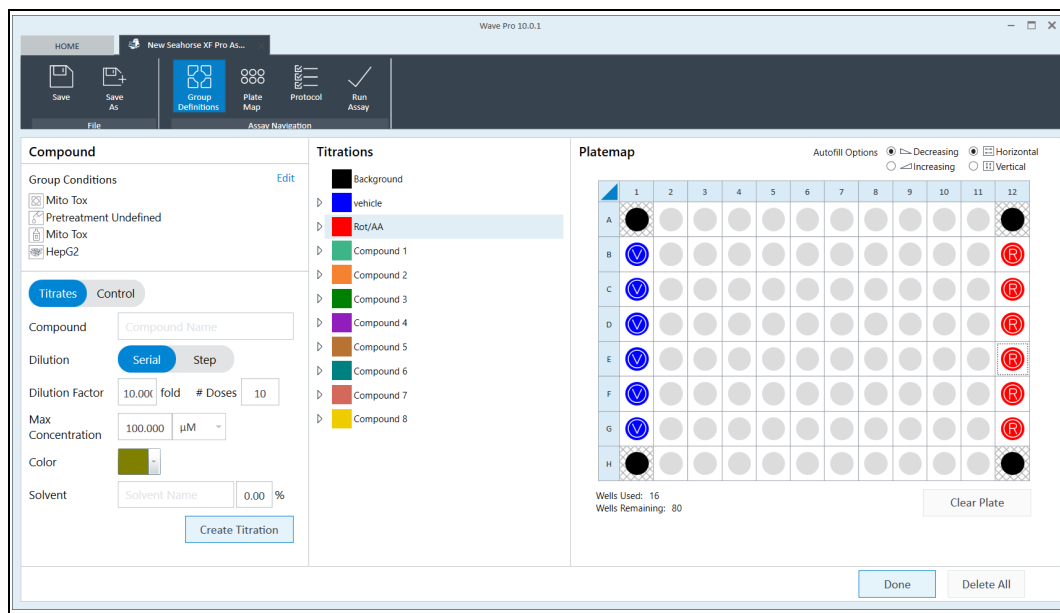
- 6 使用每种化合物左侧的下拉箭头可以查看系列稀释液中的所有浓度。所有的浓度都显示为摩尔浓度。对要测试的每种化合物重复上述过程



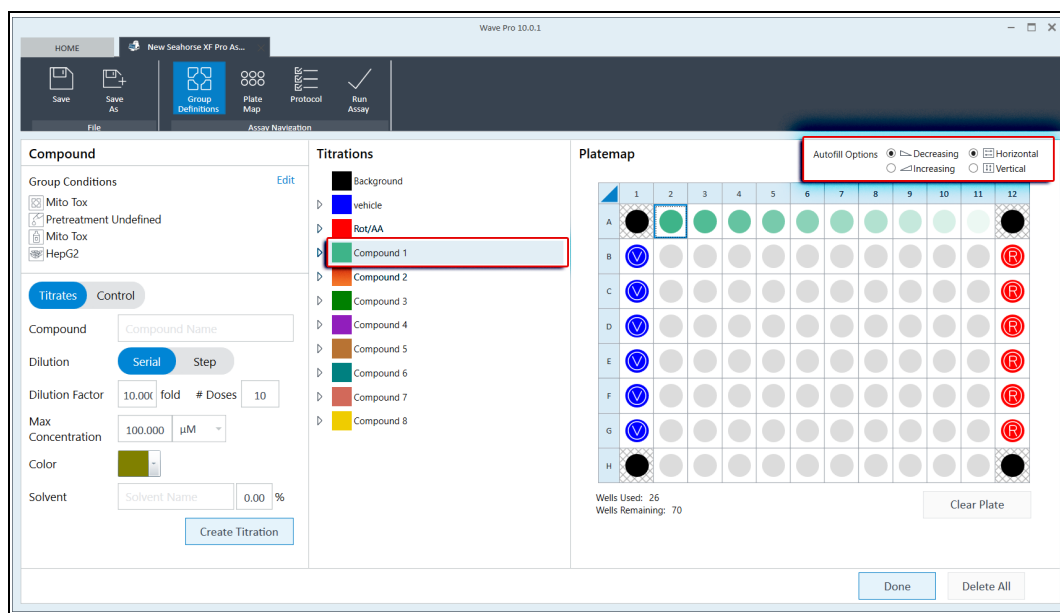
4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

- 7 创建所有组后，首先将对照组分配至孔板分布图。在组列表中选择/突出显示溶剂组或鱼藤酮/抗霉素 A 组。然后，将光标移动到 **Platemap**（孔板分布图）。单击要分配的孔。建议将溶剂组分配至第 1 列（B 行至 G 行），**鱼藤酮/抗霉素 A** 组分配至第 12 列（B 行至 G 行）。确保正确地分配对照组。如果不设置这些对照组，则不能计算 MTI 参数



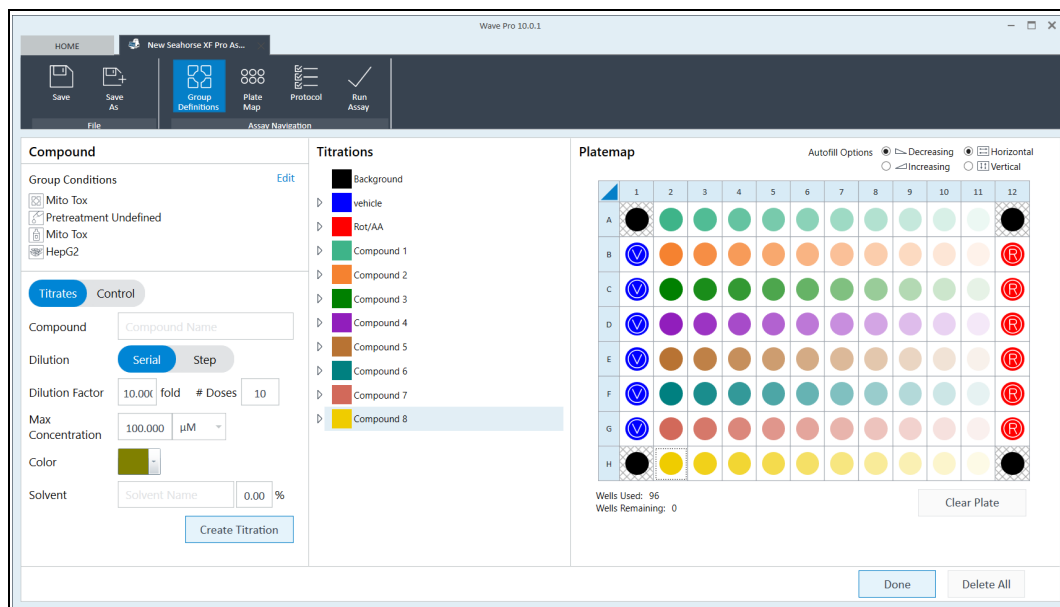
- 8 可以使用自动填充功能将化合物作为一个完整的序列分配到孔板分布图中。自动填充可以按水平或垂直方向，以及按浓度增加或降低的顺序进行分配



4 分析模板的设计和创建

定义实验组和孔板布局

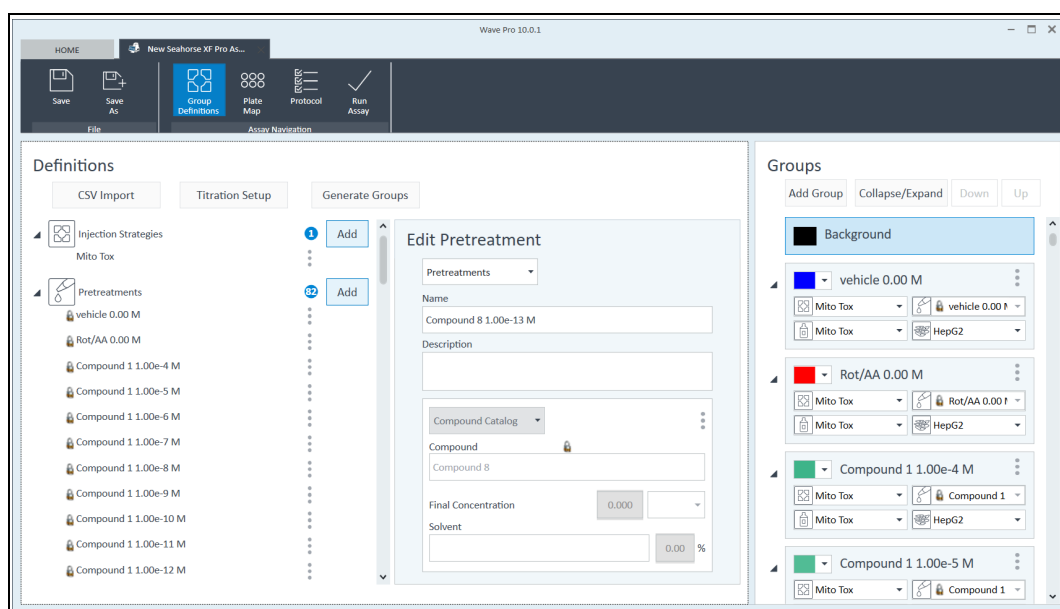
- 9 要分配系列稀释液，突出显示组列表中的父项名，选择 **Autofill Option**（自动填充选项），并在孔板分布图上选择所需位置。将在孔板分布图上自动从左到右或从上到下分配系列稀释液。这里的稀释系列示例是按水平方向浓度递减的顺序分配的。一个滴定系列中的孔采用相同的颜色，但颜色深度不同，浓度最高的孔颜色最深



- 10 分配完所有稀释系列后，单击底部的 **Done**（完成）。所有的对照和滴定都作为独特的组生成，并具有预定义的加药策略、检测液类型和细胞类型

注意

在 **Group Definitions**（组定义）视图中，不能编辑化合物组名称（在右侧面板中）和预处理名称。

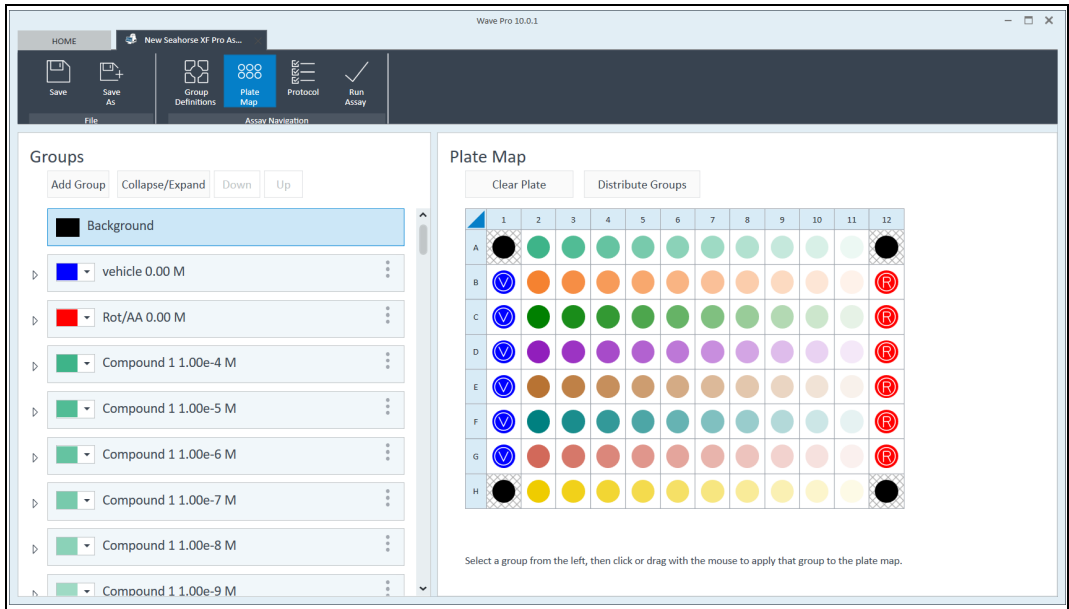


4 分析模板的设计和创建

定义仪器方案

注意

在 **Plate Map**（孔板分布图）视图中，使用 **Titration Setup**（滴定设置）工具创建的孔板分布图只能逐个孔进行编辑。



定义仪器方案

按照第 14 页的“创建用于少量化合物测试的模板”中描述的步骤定义仪器方案（第 21 页）。

现在已经完成模板创建。单击左上角的 **Save**（保存），为模板命名，然后在对话框中单击 **Save**（保存）。

Save As Template

Name: XF Mito Tox Dose Response Assay

Author: XXXXXXXX

Description: *****

Save Cancel

上传分析模板

如果使用 Seahorse Wave Pro 软件创建分析模板，请按照以下步骤将自定义分析模板上传至 XF Pro Controller 软件中。

- 1 在 XF Pro 分析仪上打开 XF Pro Controller 软件
- 2 在前面的 USB 端口插入一个 U 盘（包含自定义分析模板）或连接到一个包含自定义分析模板的网络驱动器
- 3 单击 **Import**（导入）（New Assay（新分析）视图的底部）
- 4 在 U 盘或网络驱动器中找到自定义分析模板文件
- 5 单击 Windows 对话框中的 **Open**（打开）。在 XF Pro 分析仪的 Templates（模板）视图中可以选择导入的分析模板
- 6 如有需要，再次导入下一个模板
- 7 现在可以在可用模板列表中选择导入的分析模板（或模板）

实验流程

实验前 1 天（第 1 天）	34
实验当天（第 2 天）	36
数据分析	40

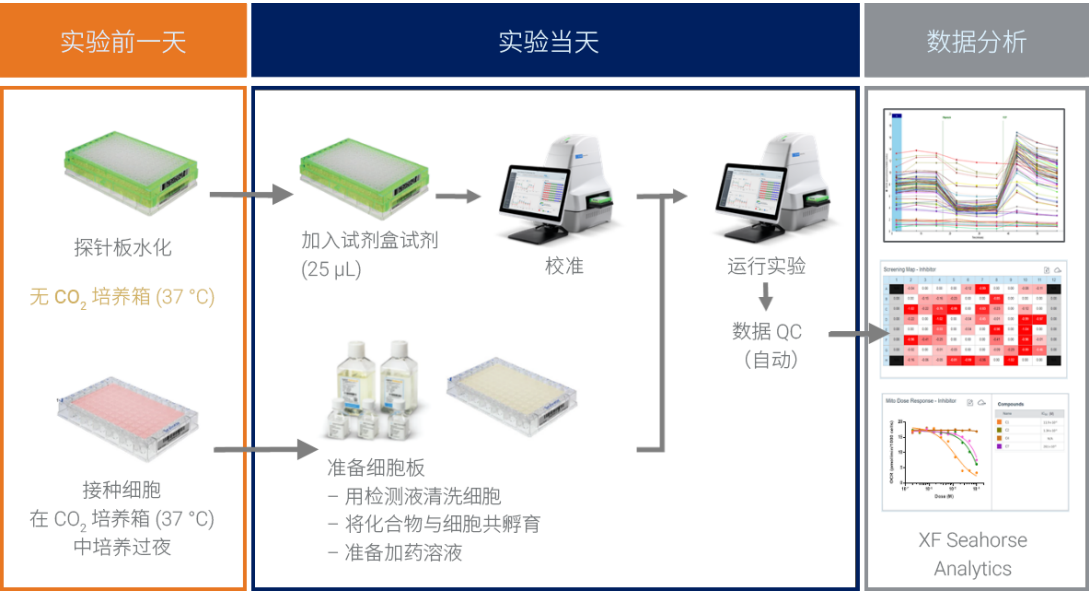


图 4. 使用安捷伦 Seahorse XF Pro 分析仪进行安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测的工作流程

实验前 1 天（第 1 天）

打开 XF Pro 分析仪并确保其热平衡至 37 °C（至少 2 小时）。

准备探针板

- 1 打开安捷伦 Seahorse XFe96/XF Pro 细胞外流量分析试剂盒并取出探针板
- 2 将探针板倒置于水化板旁边
- 3 向水化板的每个孔中加入 200 μ L 校准液，并将 XF 水化辅助板放置于水化板的顶部。确保水化辅助板已按压到位
- 4 将探针板降低到水化板上，使探针浸入校准液或水中（参见图 5 中的示意图）

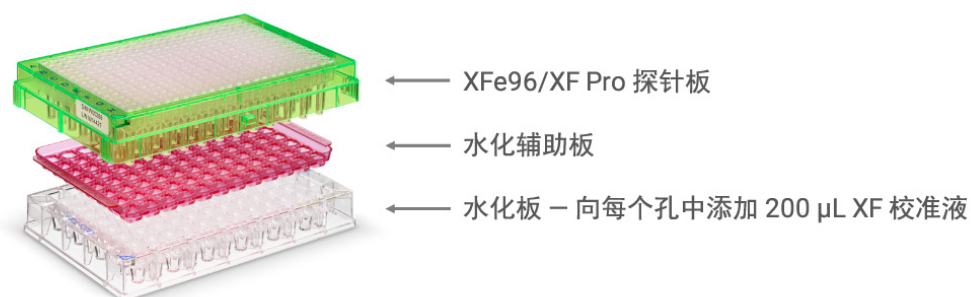


图 5. XF 探针板、XF 水化辅助板和水化板套装

- 5 确认校准液足够让探针保持浸没状态
- 6 将探针板和水化板放入无 CO₂ 培养箱中，37 °C 下过夜

在 XF Pro M 细胞培养板中接种贴壁细胞

- 1 收集细胞并将其重悬至所需的最终浓度，并接种至 80 μ L 生长培养基中（例如，对于 10×10^3 个细胞/孔，每 80 μ L 重悬 10×10^3 个细胞 = 125×10^3 个细胞/mL）
- 2 将 80 μ L 生长培养基加入至 4 个角的背景孔中（A1、A12、H1、H12）。将 80 μ L 细胞悬浮液加入每个孔中。请勿在背景孔中接种细胞

5 实验流程

设计/创建并上传分析模板

- 3 使用设置为 250 μL 的八通道 P1000 移液器将孔周围的 4 个水槽加满水（图 6）。每个水槽中将装有 1.0 mL 水（4 个吸头正好加满一个水槽）。如果没有多通道移液器，向每个水槽中加入 1.0 mL 水

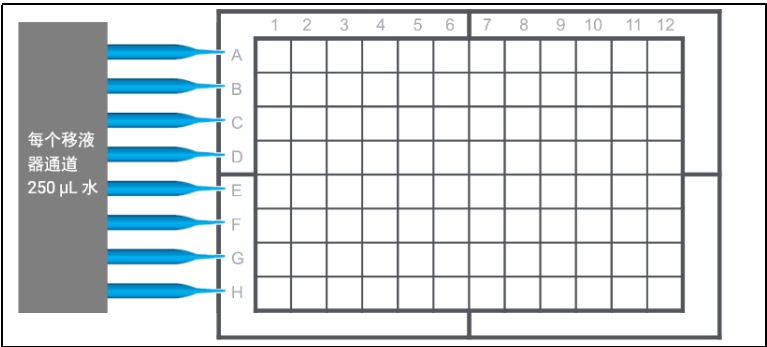


图 6. 使用八通道 P1000 移液器填充水槽

- 4 将孔板在超净工作台中放置一小时。这可以提高某些细胞类型的细胞单层的一致性。用显微镜监测贴壁情况
- 5 将细胞板置于控制湿度的 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中，让细胞生长过夜

注意

有关使用 **XF Pro M** 细胞培养板的更多信息，请参阅安捷伦文档 [5994-4356ZHCN](#)。如果使用悬浮细胞进行 **XF** 线粒体毒性检测，请参阅[安捷伦细胞分析学习中心](#)网站上的悬浮细胞接种方案，了解详细信息。

设计/创建并上传分析模板

建议在实验前一天设计/准备分析模板。确保已将模板上传到 XF Pro 分析仪的 XF Pro Controller 软件中，并且可供使用。请按照[第 4 章](#)中的说明创建分析模板。

实验当天（第 2 天）

配制检测液

- 1 配制 XF 检测液：向 97 mL Seahorse XF DMEM 培养基 (pH 7.4) 中加入 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。可以根据需要更改检测液的成分

表 3 标准 XF 线粒体毒性检测液

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

- 2 预热至 37 °C

当使用标准 XF 补充剂浓度时，不需要调节检测液的 pH。

注意

准备测试化合物、溶剂和鱼藤酮/抗霉素 A 溶液

重要提示： 化合物应在使用当天配制。丢弃所有剩余的化合物溶液。请勿冷冻和重复使用。

- 1 使用检测液配制所有测试化合物的 2x 溶液。例如，如果测试化合物的最终浓度为 100 µmol/L，则需配制 200 µmol/L 的测试化合物溶液
- 2 如果测试化合物溶液含有 DMSO 或其他溶剂，则配制 5 mL 含有相同最终浓度的 DMSO 或其他溶剂的 XF 检测液。这是溶剂对照溶液
- 3 从 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒中取出一个铝箔袋和启盖器。从铝箔袋中取出鱼藤酮/抗霉素 A 小瓶（红盖）
- 4 配制 1.0 µmol/L 的鱼藤酮/抗霉素 A 溶液 (2x)：先向瓶中加入 400 µL 检测液。涡旋使化合物溶解。然后将所有 400 µL 溶液转移至一个更大的样品瓶中，再加入 5 mL 检测液。总体积为 5400 µL

如果测试化合物溶液中含有 DMSO，建议孔中 DMSO 的最终浓度小于 1%。鱼藤酮/抗霉素 A 溶液无需 DMSO。

注意

5 实验流程

使用贴壁细胞准备细胞板，并与测试化合物预孵育

使用贴壁细胞准备细胞板，并与测试化合物预孵育

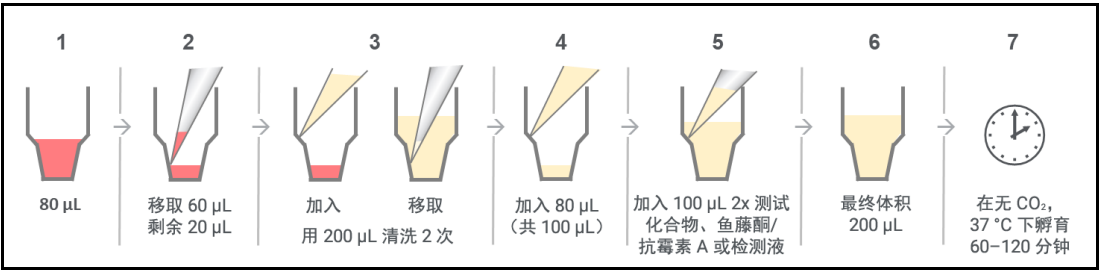


图 7. 准备 XF Pro M 细胞板以及测试化合物预孵育。每个清洗步骤留 20 µL 检测液，尽量减少对细胞单层的损伤

- 1 将细胞板从细胞培养箱中取出，在显微镜下检查细胞，确认接种细胞均一，具有适当的细胞形态，且无污染
- 2 用预热过的检测液清洗细胞板两次，如图 7 所示。清洗完成后，在每孔中留 100 µL 检测液（见图 7 中的第 4 步）
- 3 按照预先设计的模板，向每孔中加入 100 µL 2x 测试化合物溶液
- 4 在第 12 列的 8 个细胞孔中加入 100 µL 1.0 µmol/L 鱼藤酮/抗霉素 A 溶液
- 5 在第 1 列的 8 个细胞孔和 4 个角处的背景孔中分别添加 100 µL 溶剂对照溶液
- 6 将含有测试化合物和鱼藤酮/抗霉素 A 的细胞板在无 CO₂ 培养箱中，37 °C 下孵育 60–120 分钟

准备加药溶液并上样至加药口

- 1 从铝箔袋中取出寡霉素小瓶（蓝盖）和 FCCP 小瓶（黄盖）。将管放在一个小的管架上
- 2 按照表 4 中所示的检测液体积重悬每根管中的内容物。涡旋 30 秒或慢慢上下吸打溶液，使内容物溶解

表 4 制备储备液

化合物	瓶盖颜色	添加的检测液体积 (µL)	储备液浓度 (µmol/L)
寡霉素	蓝色	465	135
FCCP	黄色	720	100

5 实验流程

进行线粒体毒性检测

3 用上述步骤配制的储备液配制加药溶液，相应体积请参见表 5

表 5 制备加药溶液。在分析开始前，以 96 孔板，每孔 200 μL 来确定浓度和上样体积

加药溶液	储备液 (μL)	检测液 (μL)	加药口浓度 $\mu\text{mol/L}$	加药口浓度 倍数	孔内浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	加药口和 体积
寡霉素	300	2700	13.5	9x	1.5	加药口 A: 25 μL
FCCP	150	2850	5	10x	0.5	加药口 B: 25 μL
	300	2700	10	10x	1.0	
	450	2550	15	10x	1.5	
	600	2400	20	10x	2.0	

4 将 25 μL 寡霉素加药溶液小心地加入每个加药口 A，将 25 μL FCCP 加药溶液小心地加入每个加药口 B

5 目视检查加药口加药是否均匀。液体应该在加药口中。确保探针板顶部没有残留液滴

注意

对于不打算在实验中使用的孔的加药口 A 和加药口 B，也需要加入 25 μL 的任何溶液，以确保仪器正常工作。合适的加药口上样技术是确保实验成功的重要因素。在进行任何实验之前，建议新用户阅读[安捷伦细胞分析学习中心](#)网站上“设置分析 > 上样”部分的详细说明。

进行线粒体毒性检测

注意

如果分析模板没有上传至 XF Pro 分析仪，请参见第 35 页的“设计/创建并上传分析模板”章节，上传模板。

- 1 从可用模板列表中选择要使用的分析模板。单击 **Open File**（打开文件）（或双击模板）
- 2 检查分析用的分组（细胞类型或条件）、孔板布局图和仪器方案。如有需要，请进行修改
- 3 在查看和运行显示中，单击 **Scan Assay Kit**（扫描检测试剂盒），以显示检测试剂盒信息对话框

注意

如果使用了 XF Discovery 授权码，则不需要执行第 3 步至第 5 步。继续进行第 6 步。

- 4 使用外部手持式条形码扫描器扫描试剂盒标签上的条形码（外部）。这会自动将检测试剂盒的货号和批号添加到此对话框中
- 5 在 SW ID 字段中，手动输入试剂盒标签上的 SW 代码。单击 **Apply**（应用）。软件将会把这些信息嵌入到数据文件中
- 6 准备好后单击 **Start Run**（开始运行），开始分析

5 实验流程

进行线粒体毒性检测

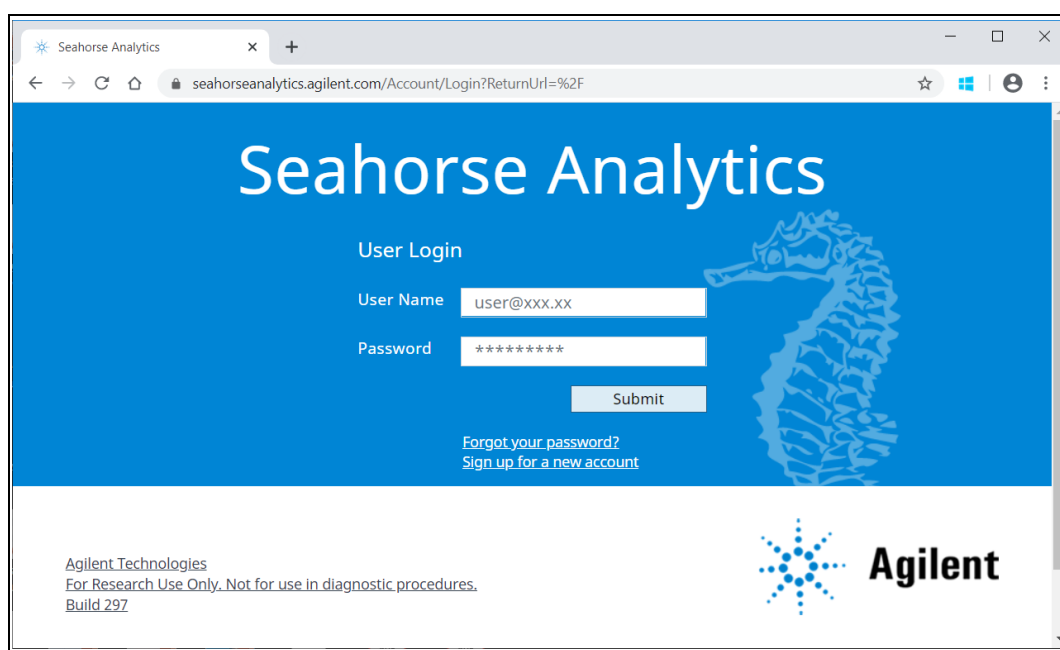
- 7 出现提示时，请取下探针板盖子，然后将带有水化板的已加药的传感器探针板置于 XF Pro 分析仪的热托盘上。确保板的放置方向正确并已取下探针板的盖子。然后，单击 **I'm Ready**（准备就绪）。校准大约需要 15 至 30 分钟
- 8 完成校准后，XF Pro Controller 显示 **Load Cell Plate**（加载细胞板）对话框。单击 **Open Tray**（打开托盘）以弹出水化板并放入细胞板。放入细胞板前确保盖子已取下
- 9 单击 **Load Cell Plate**（加载细胞板）运行分析

数据分析

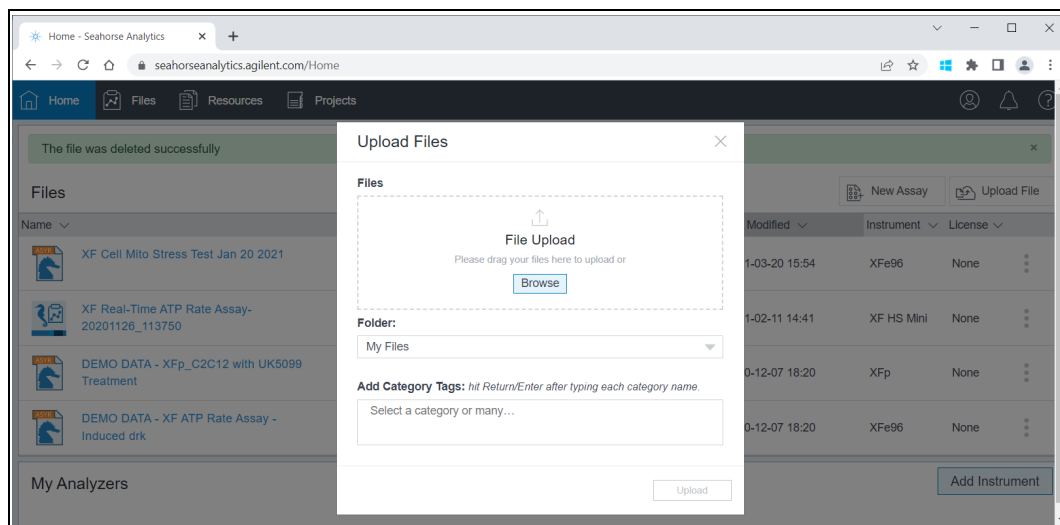
使用安捷伦 XF Seahorse Analytics 可以轻松进行 XF 线粒体毒性检测的数据分析和结果报告，Seahorse Analytics 是一个基于网页的软件平台，具有专用的检测助手视图。这些软件功能可以自动计算 MTI 和 Z' 值，并以热图或柱状图显示 MTI 值。绘制剂量反应曲线，并计算 IC₅₀ 或 EC₅₀ 值。这可以简化数据分析工作流程，并快速获得系统的可共享的总结报告。有关参数计算的详细信息，请参阅 Rogers 等人^[4] 撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5] 撰写的安捷伦应用简报。访问这些分析视图需要安捷伦 Seahorse XF Discovery 软件授权码（仅适用于 XF Pro 分析仪）或有效的检测试剂盒。

按照以下步骤使用 Seahorse Analytics 中的相关分析应用工具：

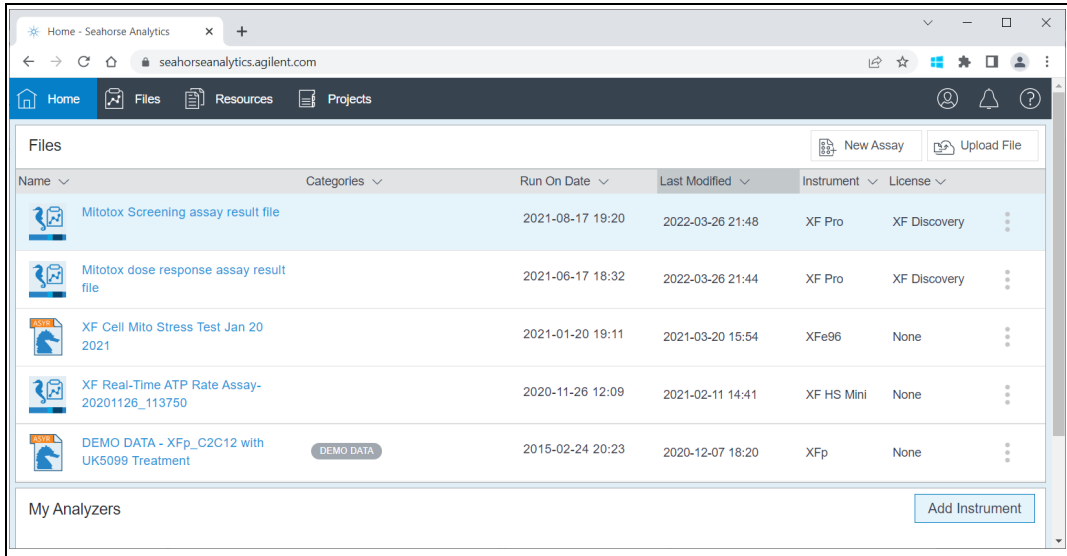
- 1 请访问 <https://seahorseanalytics.agilent.com> 注册或登录您的 Seahorse Analytics 账户



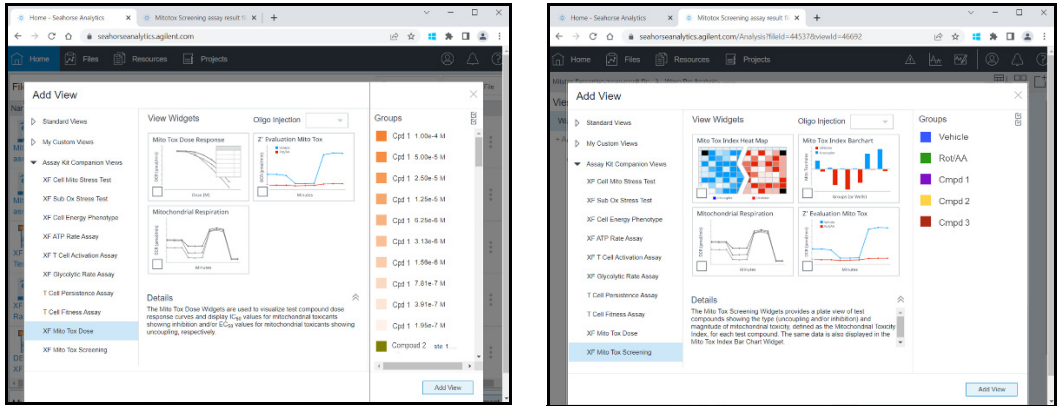
- 2 将分析结果文件上传至您的账户



3 单击分析结果文件，将出现 **Add View**（添加视图）对话框



4 在 **Assay Kit Companion Views**（检测试剂盒助手视图）菜单下，如果结果文件来自筛选实验，则选择 **XF Mito Tox Screening**（XF 线粒体毒性筛选）分析视图；如果结果文件来自剂量反应分析，则选择 **XF Mito Tox Dose**（XF 线粒体毒性剂量）分析视图



注意

XF 线粒体毒性筛查和 XF 线粒体毒性剂量分析视图只能通过 Discovery 授权码或 XF 线粒体毒性测定试剂盒中包含的信息访问。如果结果文件加盖了 Discovery 授权码，则不需要进行其他操作。如果结果文件没有加盖 Discovery 授权码，您可以通过在 Files（文件）视图中单击文件右侧的三点式菜单，将试剂盒信息手动输入到文件中。这将解锁这些分析视图。

- 5 在 View Widgets（视图应用工具）窗口中选择所需的分析应用工具，确保 **Oligo Injection**（寡霉素加药）已设置为正确的位置（默认是加药 1），然后单击底部的 Add View（添加视图）
- 6 单击窗口右上角的感叹号按钮，查看自动数据质量测试，以验证数据可靠性
- 7 进行数据检查

如需了解有关使用 Seahorse Analytics 的更多信息，请访问[安捷伦细胞分析学习中心](#)网站。有关应用和结果数据的示例，请参阅 Rogers 等人^[4] 撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5] 撰写的安捷伦应用简报。

此页有意留为空白。

6 XF 线粒体毒性检测：替代工作流程

图 3 中的示意图介绍了开展 XF 线粒体毒性检测时可能采用的 3 种工作流程。除了向细胞中加入测试化合物的时间有所不同，所有其他流程都是相同的。“预孵育”工作流程在将细胞培养基更换为 XF 检测液时，向细胞中加入测试化合物，以评估短期（约 60–90 min）化合物影响。这是首次进行 XF 线粒体毒性检测时推荐使用的方​​法（通常也最简单）。

作为替代方法，可以使用加药口原位加入化合物（图 3，工作流程 A）。这种急性加药方法的优势在于可以实时动态追踪化合物的任何急性效应。在使用该工作流程时，需要对流程进行一些调整。

- 如果需要急性加药，则在最后一次清洗步骤时，将每个孔中的起始体积调整为 175 μL （图 7 中的第 6 步），作为分析开始前的最终体积
- 对于待加药的测试化合物，配制 8x 溶液（使加药后孔内的最终浓度为 1x），将 25 μL 的各测试化合物溶液加入 XF 探针板对应的加药口 A
- 25 μL 的 8x Rot/AA 溶液应上样至 Rot/AA 对照组孔的加药口 A 中。在所有孔的加药口 B 和 C 中分别加入 25 μL 寡霉素和 FCCP 溶液

还可以对 XF 线粒体毒性检测进行调整，以实现较长时间的化合物暴露（数小时至数天，图 3C）。虽然这能够评估长时间化合物处理带来的影响，但它需要在细胞培养期间提供化合物。在将培养基更换为检测液时，需要再次提供化合物。

- 如需研究较长时间的化合物影响，应确定化合物暴露的时长，并在细胞培养过程中按所需浓度提供每种测试化合物
- 在细胞培养过程中，可以向 Rot/AA 对照组的孔中提供 Rot/AA（类似于测试化合物），但必须在将培养基更换为检测液时，重新向 Rot/AA 对照组的孔中提供 Rot/AA
- 当细胞在这些化合物下的暴露时间达到要求后，按照“预孵育”工作流程的说明进行操作（图 3B 和上文所述）

注意，在本检测中要考虑的主要变量是化合物的浓度和细胞在化合物下暴露的时长。请参阅第 10 页的表 2 以及 Kam 等人^[5]在安捷伦应用简报中的相关讨论，了解图 3 中各种线粒体毒性检测工作流程的注意事项。

此页有意留为空白。

常见问题解答

使用什么类型的细胞来开发和验证 XF 线粒体毒性检测工作流程？

HepG2 细胞通常用于评估药物诱导的线粒体毒性，我们使用它来开发和验证 XF 线粒体毒性检测工作流程。

其他类型的细胞是否可用于 XF 线粒体毒性检测工作流程？

是的，可以使用其他类型的细胞。XF 线粒体毒性检测基于 XF 细胞线粒体压力测试，后者已成功应用于多种细胞类型，包括细胞系、原代细胞和悬浮细胞。但是，需要优化检测条件，包括细胞接种密度和 FCCP 浓度。这些优化实验可以通过 XF 细胞线粒体压力测试进行。

我可以改变检测液的成分吗？

可以。建议在标准 XF 检测条件下进行初始 XF 线粒体毒性检测（见第 36 页的表 3）。可以使用替代检测液，包括替代基础培养基、底物和/或其他补充剂。但是，需要优化检测条件，包括细胞接种密度和 FCCP 浓度。

可以在 XF 线粒体毒性检测液中添加 BSA 和/或血清吗？

可以。可以在 XF 线粒体毒性检测液中添加 BSA 和/或血清，并用于细胞培养孔。但是，加药口不能使用含 BSA 或血清的培养基。当 XF 检测液中含有 BSA 或血清时，必须对实验进行优化，包括优化细胞密度和 FCCP 浓度。BSA 或血清的存在通常会影响化合物效价，可能需要更高浓度的化合物（例如 FCCP）才能引起最佳反应。

我需要在半乳糖培养基中培养细胞以进行 XF 线粒体毒性检测吗？

不需要，细胞生长培养基和 XF 检测液中不需要添加半乳糖。

在进行 XF 线粒体毒性检测之前，细胞应在测试化合物中暴露多长时间？

这是研究者的一个关键决定。建议从短期工作流程开始，即在开始检测前 1-2 小时向细胞中加入化合物。这足以研究化合物对线粒体功能的短期影响。如需研究长期化合物影响（4-72 小时），必须在细胞培养基中加入化合物溶液。强烈建议在将培养基更换为 XF 检测液，并在进行检测之前，向细胞中添加相同浓度的化合物。在解释化合物长期暴露的结果时必须谨慎，因为它们可能产生复杂的下游影响，涉及线粒体毒性和细胞毒性之间的相互作用。进一步的讨论，请参阅 Rogers 等人^[4]撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5]撰写的应用简报。

我是否需要在每个实验中都设置溶剂对照组和 Rot/AA 对照组？

是的。需要这些对照组来计算 MTI 值，以及随后在剂量反应实验中计算 IC_{50} 值和 EC_{50} 值。它们也可用于计算检测性能指标 Z' 值。

为什么对照组是指溶剂对照组和 Rot/AA 对照组，而不是阳性或阴性对照组？

在计算解偶联剂 MTI 和相关 Z' 值时，溶剂对照组的最小 Oligo OCR 为阴性对照，溶剂对照组的最大 FCCP OCR 为阳性对照。相反，在计算抑制剂 MTI 和相关 Z' 值时，溶剂对照组的最大 FCCP OCR 为阴性对照，Rot/AA 对照组的最小 FCCP OCR 为阳性对照。换句话说，根据计算的 MTI 值，溶剂对照组可以作为阳性对照或阴性对照。为了避免混淆，在本文中，不将阴性或阳性对照用于表示这些对照组。

抑制剂 MTI 值是否可以小于 -1？

可以，但是很少见。通常，大多数抑制剂的 MTI 值在 0 到 -1 之间。测试化合物的 MTI 值可能略低于 -1（根据定义，这是在 Rot/AA 对照组中观察到的抑制水平）。在这些情况下，该化合物可能是一种很强的线粒体抑制剂或可能导致细胞毒性作用。

解偶联剂 MTI 值可以大于 1 吗？

可以。通常，大多数解偶联剂的 MTI 值在 0 到 1 之间。测试化合物的 MTI 值可能略高于 1（根据定义，这是溶剂组对 FCCP 响应时的解偶联水平）。这可能是一种很强的解偶联剂；然而，应注意确保 FCCP 的浓度经过优化，并引起最大呼吸 (OCR)。这是因为使用的 FCCP 并非最优浓度时，可能导致 MTI 值显著大于 1。

解偶联的 MTI 值可以计算出负值吗？

可以。当强抑制剂使 Oligo OCR 降低到溶剂对照组的 Oligo OCR 水平（作为解偶联的阴性对照）以下时，就会出现这种情况。在这种情况下，MTI 值报告为 0。

抑制的 MTI 值可以计算出正值吗？

可以。当强解偶联剂使 FCCP OCR 增加到高于溶剂对照组的 FCCP OCR 水平（作为抑制的阴性对照）时，就会出现这种情况。这会导致抑制的 MTI 值为正值。在这种情况下，MTI 值报告为 0。

一种化合物在同一浓度下会同时显示负 MTI 值和正 MTI 值吗？

是的，在同一浓度下，一种化合物可能同时引起解偶联（正 MTI）和抑制（负 MTI）反应。这在解偶联剂中很常见，建议在初步筛选实验后进行下游剂量反应分析，以进一步评估并确定化合物的作用模式。关于这一主题的更多信息，请参阅 Rogers 等人^[4]撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5]撰写的安捷伦应用简报。

在不同的化合物浓度下，毒性的表现模式是否会发生变化，或者取决于细胞暴露于化合物的时间长短？

是的。对解偶联剂而言尤其如此。在低浓度和短时间孵育（几分钟到几小时）后，解偶联剂通常会引起 Oligo OCR 升高。然而，同一化合物在更高的相对浓度下，和/或经过更长的孵育时间（数小时至数天）后，可引起 FCCP OCR 降低（这意味着它表现为抑制剂）。随着化合物浓度的增加，由于非特异性作用，毒性模式也可能发生变化。进一步的讨论，请参阅 Rogers 等人^[4]撰写的安捷伦白皮书和 Kam 等人^[5]撰写的安捷伦应用简报。

在进行 XF 线粒体毒性检测时，我可以使用/解释 ECAR/PER/pH 信号吗？

该检测的主要目的是快速、准确地识别和量化线粒体毒性。虽然可以从细胞外酸化率 (ECAR) 或质子流出率 (PER) 信号观察到化合物的影响，但建议在根据 ECAR 或 PER 信号变化作出任何解释时要谨慎。后续必须进行专门测定糖酵解 PER 的实验（XF ATP 速率测定，XF GRA 检测），以确保在这些情况下做出可靠的解释。值得注意的是，一些测试化合物可能会改变 XF 检测液的 pH 值，从而影响 ECAR 信号。查看 pH 数据可以帮助了解加入化合物后，检测液的 pH 值是否发生了显著变化。

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44678.2712037037

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022

第一版，2022 年 4 月



5994-3715ZHCN A0 版

