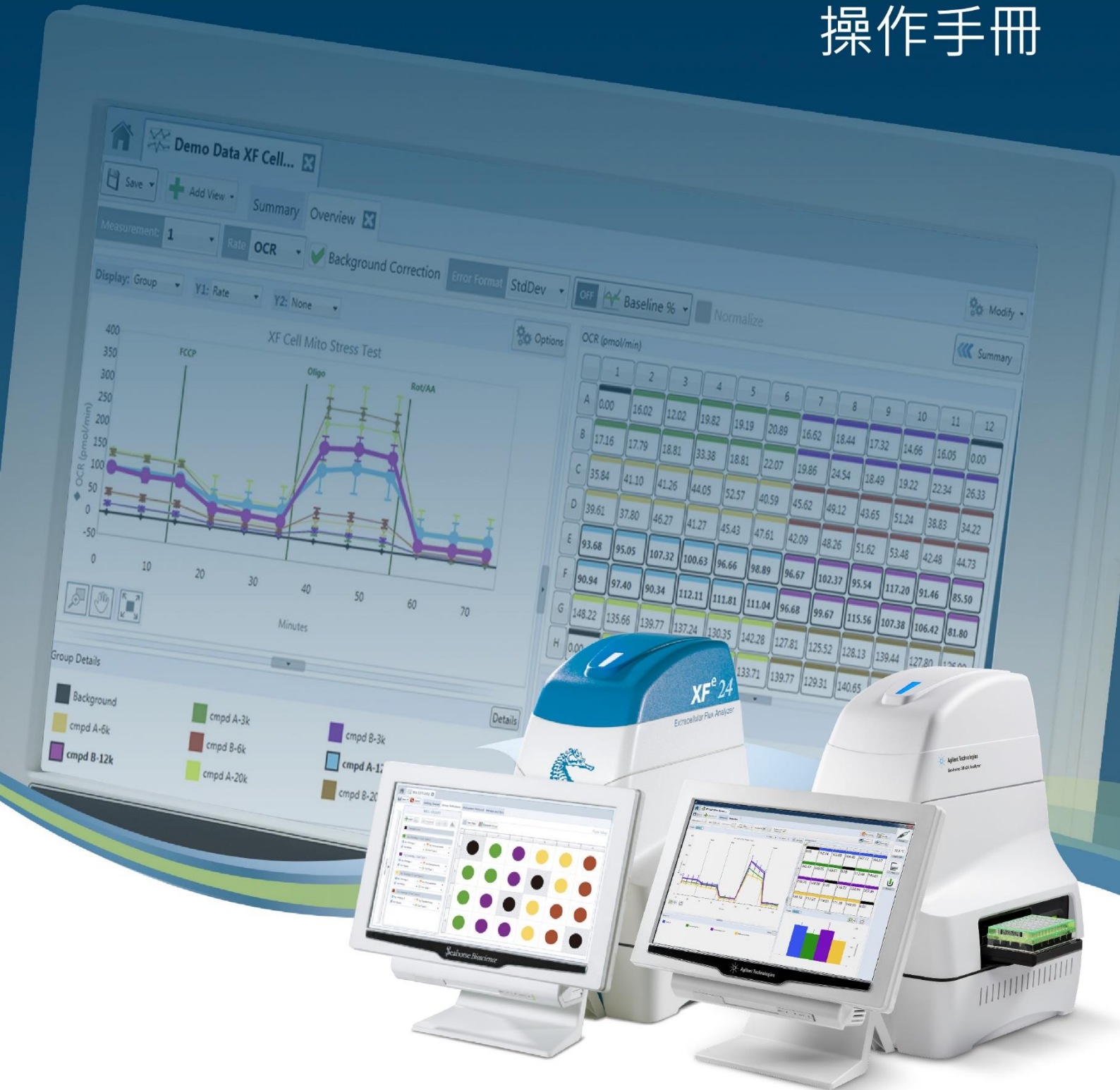


XF Flex/ XFe24

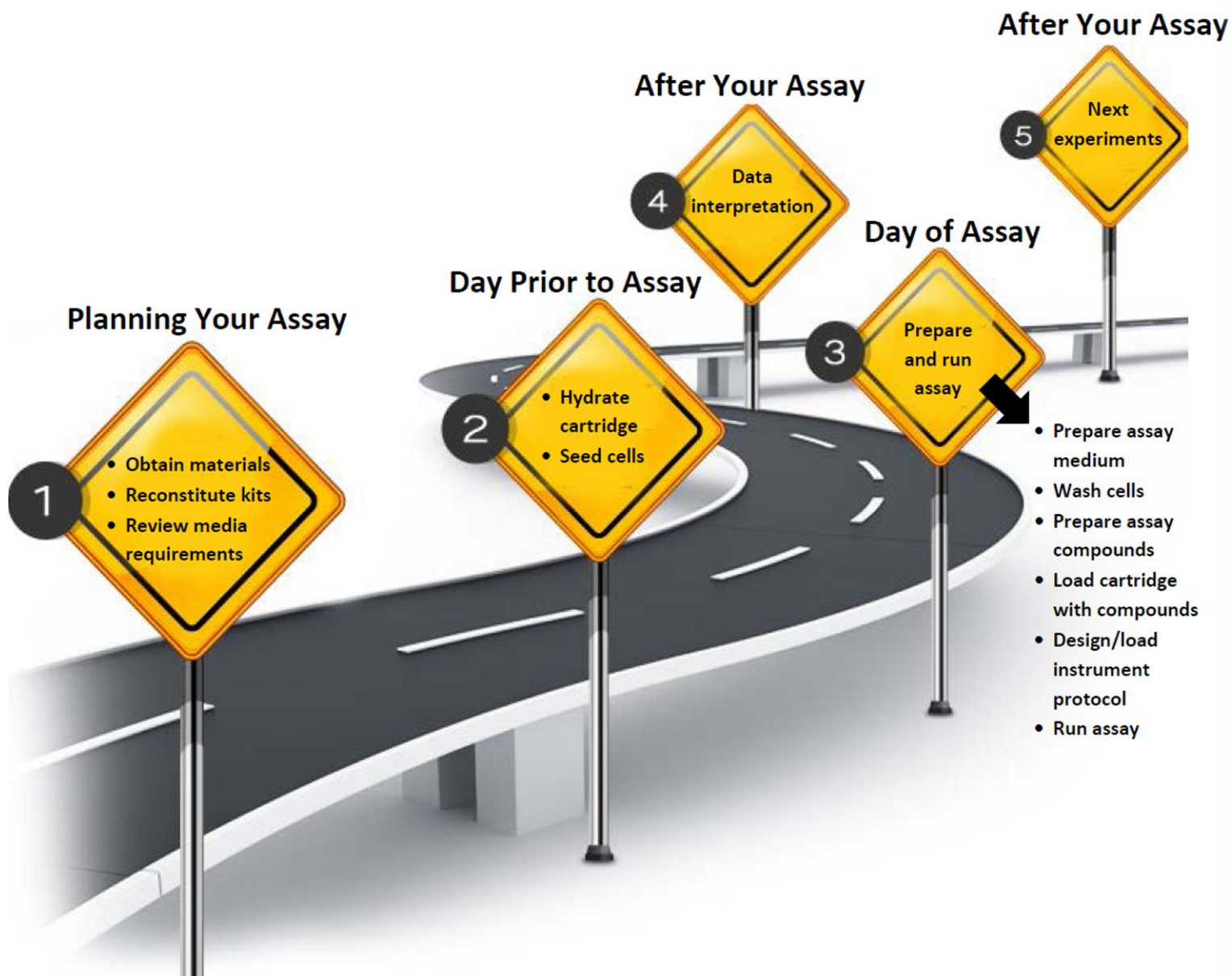
海馬生物能量測定儀 操作手冊



目錄

XF Assay Roadmap	3
1. 確認海馬的使用機型與正確搭配的耗材	4
2. 選擇您的加藥試驗	5
a. Mito Stress Test	
b. Glycolysis Stress Test	
c. Glycolytic Rate Assay	
d. Substrate Oxidation Stress Test	
e. Real-Time ATP Rate Assay	
f. Human T Cell Activation Assay	
g. Complex protein Activity & Substrate Utilization	
3. 準備上樣用的細胞	12
4. 準備上樣用的培養基	16
5. 活化螢光探針組	19
Day Before Assay	
<hr/>	
Day of Assay	
6. 更換上機用培養基	20
7. 準備上機用的藥物	21
8. 將藥物放置在注藥槽內	25
9. FCCP Titration Test	26
10. 上機與軟體操作	27
11. 數據分析	32

XF Assay Roadmap



1. 確認您使用的海馬機型

XFe Flex / XFe 24 Analyzer



並搭配正確的耗材

XFe 24 FluxPak

102340-100



適用於細胞實驗

XFe 24 Islet FluxPak

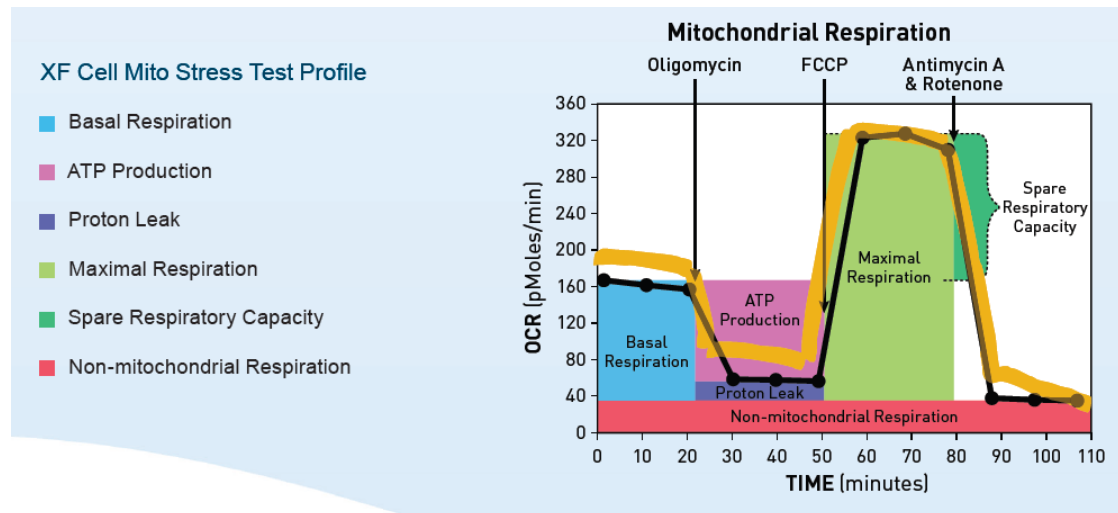
103518-100



適用於活體組織樣本

2. 選擇您的加藥試驗

A. Mito Stress Test：完整評估粒線體功能的加藥測試



Basal Respiration：粒線體於基礎狀態時的耗氧效率

ATP Production：評估粒線體有多少氧氣參與產生 ATP

Proton Leak：反應粒線體雙層膜的完整性，類似傳統的 MMP

Maximal Respiration：評估粒線體的極限運作效率

Spare Capacity：評估粒線體所保留的潛力，也就是遇到變化可調整的彈性

Non-Mito Respiration：粒線體以外的耗氧，若細胞內有許多 ROS 其值會增加

對應藥物組：

XF cell mito stress test kit

103015-100

內容物包含

- ✓ Oligomycin
- ✓ FCCP (須測試最佳濃度)
- ✓ Rotenone/Antimycin A

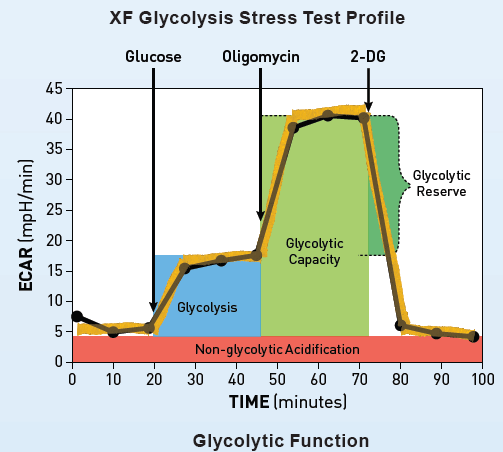
(可進行 6 盤實驗)



B. Glycolysis Stress Test：評估糖解作用的極限運作能力

XF Glycolysis Stress Test Profile

- **Glycolysis**
Measurement rate of glycolytic process.
- **Glycolytic Capacity**
Maximum response to glycolytic demand from stress.
- **Glycolytic Reserve**
Reserve capacity available to utilize glycolysis beyond the basal rate.



Glycolysis：評估樣本從 no glucose 到瞬間 glucose 濃度飽和時的運作效率

Glycolytic Capacity：評估當糖解作用為樣本唯一 ATP 來源時的運作效率

Glycolytic Reserve：反應糖解作用代償粒線體能量缺口的狀況

Non-glycolytic Acidification：分析糖解作用以外的產酸背景值

對應藥物組：

XF glycolysis stress test kit

103020-100

內容物包含

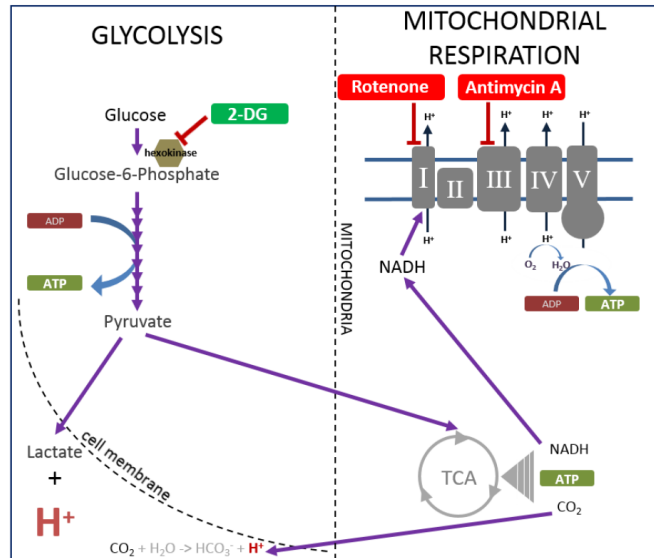
- ✓ Glucose
- ✓ Oligomycin
- ✓ 2-DG

(可進行 6 盤實驗)

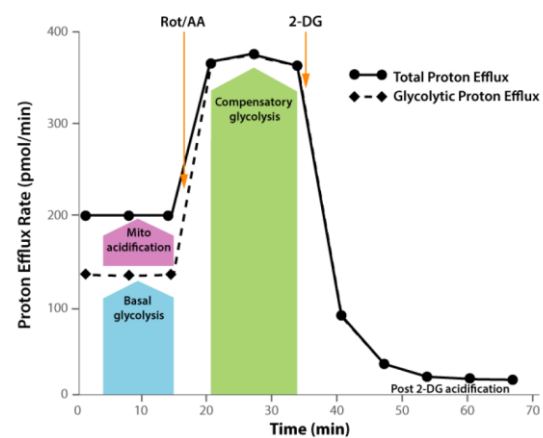


C. Glycolytic Rate Assay：更精準定量糖解作用

ECAR 為細胞外產酸率；糖解作用雖然是主要的產酸來源但並非唯一，TCA cycle 所產生的 CO₂ 亦會產生 proton，所以若細胞粒線體運作效率越高，ECAR 值也會隨之提高；為了排除 TCA cycle 產酸的干擾，原廠以確立了 Buffer factor 的培養基為基礎，輔以嚴謹的公式以扣除粒線體的產酸率，讓糖解作用的偵測達到真正的定量。



實驗設計依序加入 Rot/AA & 2-DG，實驗後輸出 Report generator 扣除粒線體產酸 (Mito acidification) 後得到正確定量的糖解作用效率 (Basal glycolysis)；此實驗適合需要精準定量糖解作用的實驗室。



對應藥物組：

XF glycolytic rate assay kit

103344-100

內容物包含

- ✓ Rot/AA
- ✓ 2-DG

(可進行 6 盤實驗)

需搭配已知 Buffer Factor 培養基

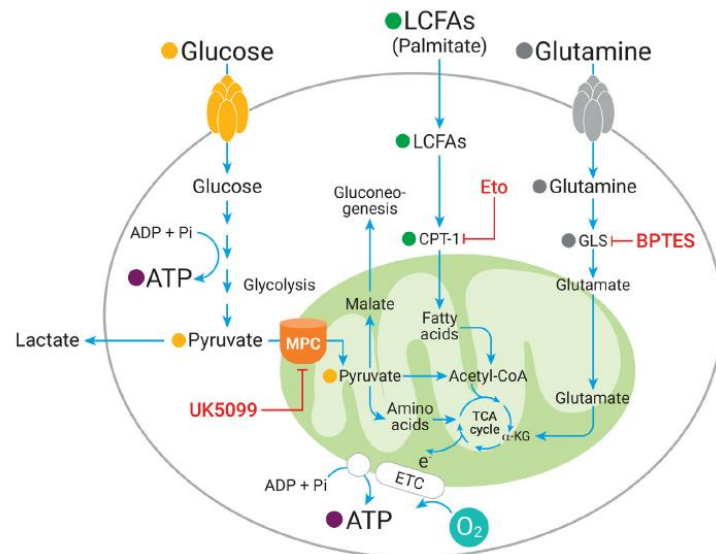
- ✓ 103575-100, XF DMEM Medium with HEPES
- ✓ 103576-100, XF RPMI Medium with HEPES

Seahorse Bioscience

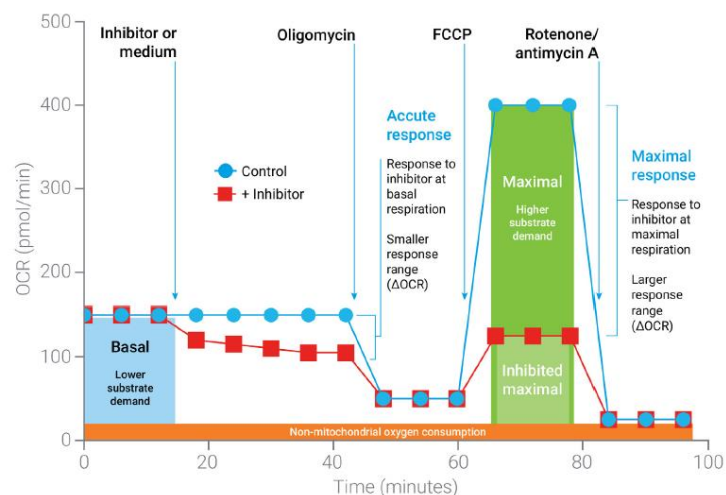


D. Substrate Oxidation Stress Test :

粒線體的燃料可使用 Glucose, fatty acids & glutamine; 評估粒線體較偏好使用哪一種燃料有助於釐清整體代謝的變化。舉例來說：癌症細胞對於 Glucose 的依賴度會上升; memory T cell 對於 Fatty Acids 的依賴度會上升。



由於代謝有自我調整為恆定的特性，所以必須以粒線體壓力測試為基礎，配合各個抑制劑才可達到最好的效果。各個抑制劑會第一個注入細胞，會先得知 acute response，FCCP 注入放大訊號後會得知 Max response。



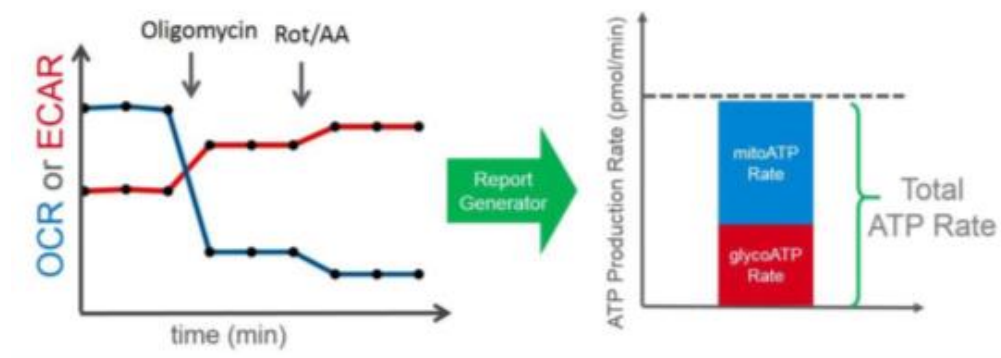
對應藥物組：

- ✓ 103673-100, XF Glucose/Pyruvate Oxidation Stress Test Kit
包含 3 次實驗藥劑內含：UK5099, oligomycin, FCCP & Rotenone/Antimycin A
- ✓ 103674-100, XF Glutamine Oxidation Stress Test Kit
包含 3 次實驗藥劑內含：BPTES, oligomycin, FCCP & Rotenone/Antimycin A
- ✓ 103693-100, XF Palmitate Oxidation Stress Test Kit
包含 103672-100 XF Long Chain Fatty Acid Oxidation Stress Test Kit
包含 3 次實驗藥劑內含：Etomoxir, oligomycin, FCCP & Rotenone/Antimycin A
並包含 102720-100 XF Palmitate-BSA/XF BSA Control; Seahorse L-carnitine
- ✓ 103260-100, XF Mito Fuel Flex Test Kit
包含 6 次實驗藥劑內含：UK5099, BPTES and Etomoxir

E. Real-Time ATP Rate Assay：更精準深入的即時 ATP 偵測

傳統 ATP Kit 僅能測量細胞內的 total ATP，但是 ATP 是由粒線體與糖解作用兩個來源所組成；許多實驗室使用傳統 ATP kit 測量後發現沒有差別，但這兩大來源可能已經此消彼長，主容易位了。

依序注入 Oligomycin & Rot/AA 兩種藥物，實驗結束後輸出 Report Generator 自動化計算出以下數據 1. Total ATP 2. mitoATP 3. glycoATP 4. XF ATP rate index；此實驗需使用已知 buffer factor 的培養基，才可正確換算其數值。



對應藥物組：

XF Real-Time ATP Rate Assay Kits

103592-100

內容物包含

- ✓ Oligomycin
- ✓ Rot/AA

(可進行 6 盤實驗)

需搭配已知 Buffer Factor 培養基

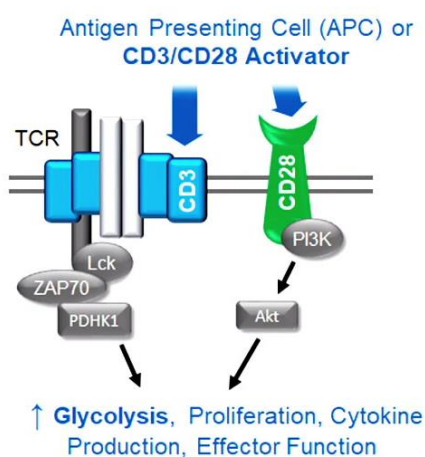
- ✓ 103575-100, XF DMEM Medium with HEPES
- ✓ 103576-100, XF RPMI Medium with HEPES



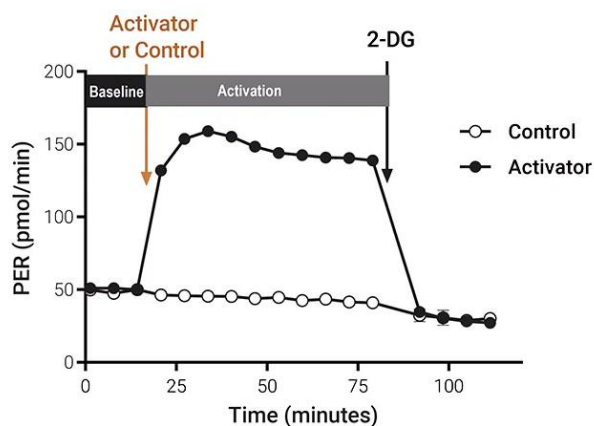
F. Human T Cell Activation Assay

人類 T 細胞活化後在數分鐘內就會有明顯的代謝改變，糖解作用會大幅上升，粒線體則無明顯變化；此代謝的調整會進而影響細胞的增生、體積變大與分化，因此研究人類 T 細胞活化可協助進一步了解 T 細胞的功能性。

實驗是使用 Agilent-validated ImmunoCult Human CD3/CD28 活化 T 細胞，偵測活化一小時的變化後注入 2-DG 關閉糖解作用，以確認糖解作用活化的數值。



Seahorse XF Hu T Cell Activation Assay Profile



對應藥物組：

XF Hu T Cell Activation Assay Kit

103759-100

內容物包含

- ✓ ImmunoCult human CD3/CD28 T cell activator
- ✓ XF 2-Deoxy-D-Glucose

(可進行 2 盤實驗)

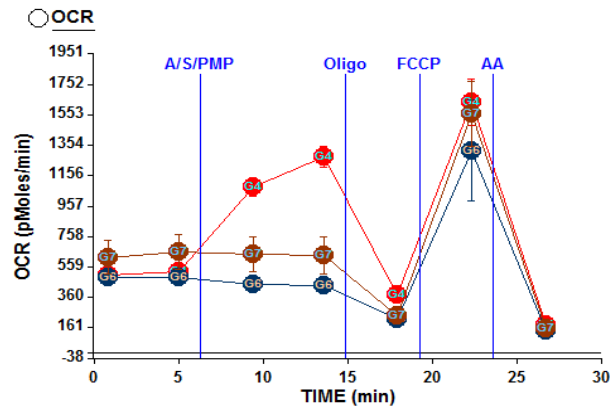
需搭配已知 Buffer Factor 培養基

- ✓ 103576-100, XF RPMI Medium with HEPES



G. Complex protein Activity & Substrate Utilization

使用 plasma membrane permeabilizer (PMP)處理細胞，可有效穿透細胞膜但不傷害粒線體；因此可在不分離粒線體的前提下加入大型複合物如：ADP, succinate 等來進行傳統的粒線體功能評估。



對應藥物組：

XF Plasma Membrane Permeabilizer

102504-100

內容物包含

✓ PMP

(可進行約 10 盤以上實驗，須測試最佳濃度)



3. 準備上樣用的細胞

需要測試上機所需細胞數量

海馬的偵測原理為製造微小空間時偵測單位時間的耗氧量與產酸率，細胞必須要貼附在底部，懸浮性細胞則需黏附上去，如此每次偵測到的細胞數才是固定的；若偵測時細胞數過少可能會偵測不到訊號，若細胞數過多則可能會造成細胞壓力而改變細胞代謝，進而產生錯誤的結果；因此偵測時的細胞數建議為單層接近全滿約 95% 為最佳。

使用一般的 96 well plate 進行測試

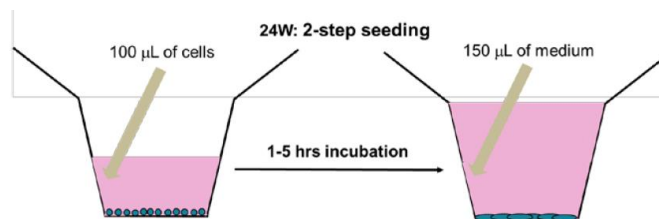
細胞培養盤底面積為 28.26 mm²，與一般標準 96 well plate 大小相近，為了確保上機時可得到足夠的訊號，請先以實驗室 96 well plate 進行測試，實驗前需種多少細胞數於上機時可接近全滿。

將 Blank Well 空下來

由於溫度與溶氧量有相當高的關係，所以請將 A1, B4, C3, D6 空下來，不種細胞只補培養基，作為上機溫度背景校正。

2-Step Cell Seeding

為了讓細胞分佈均勻，建議採用下述方式種細胞；實驗前一天，將確定的細胞數懸浮在 100 μ L 平常使用的 culture medium 內，注入細胞盤底部後放置於培養箱內直到細胞貼附(細胞貼附時間依細胞特性而定，一般約 1~5 小時)，將培養盤取出再加入 150 μ L 培養基以確保隔天上機前細胞有足夠的養分，如此就可放回培養箱於隔日進行實驗。



懸浮性細胞準備流程

海馬偵測時會在細胞盤底部製造微小空間進行測量，為了讓每次偵測時細胞數都是一致的，建議將懸浮性細胞黏附在細胞底部進行實驗。

Coating Plate

務必實驗當天新鮮 Coating 以達最佳效果。

Coating material 不可使用有厚度的 Matrigel；若實驗室有將懸浮細胞黏附的 Coating material 相關經驗可沿用，如 poly-L-Lysine, fibronectin, collagen 等；若無相關經驗可使用原廠建議的 **Cell-Tak**：

Materials

1. Cell-Tak Cell and Tissue Adhesive (Corning #354240)
從藍貝 (*Mytilus edulis* 貽貝屬) 萃取出來的細胞外基質蛋白，此蛋白是藍貝在海邊固定在岩石上的主要成分；不具有免疫刺激性，非常適合作為生物膠使用來黏附細胞。
2. NaHCO₃ (Sigma, S5761)
取420mg NaHCO₃溶於50ml 滅菌水中，調整pH值至8.0，以0.22 um 濾網過濾後存放於4°C備用，此為0.1M之NaHCO₃溶液。
3. Sterile Water

Procedure

1. 以Cell-Tak處理細胞培養盤
計算使用量：Cell-Tak的建議使用量是每平方公分3.5ug。
以2.54 MG/ML包裝為例進行下列計算：
取13 uL Cell-Tak原液加入1.5ml的NaHCO₃溶液中；每個well加入50 uL。

將plate置於Laminar Flow內抽氣，蓋子打開靜置20min；20min後將液體移除，加入200uL 2次水後再移除以去除殘留的NaHCO₃，再將蓋子打開靜置20min至盤子乾燥後就可準備加入細胞黏附。

2. 黏附細胞

於Laminar Flow內操作，因為若溫度高於37°C cell-tak黏性會下降。將準備要黏附的細胞數置於 100uL上機用的培養基(不可含有血清)內靜置30min；於顯微鏡下確認細胞數量與密度適合進行實驗後再加入額外的上機用培養基補至上機體積(675uL)，於顯微鏡下確認細胞仍穩定黏附後將培養盤放到37°C non-CO₂的空間等待上機。

若細胞有黏附不牢的情形，可嘗試加入細胞後將盤子離心，作法如下：

- 確認離心前整個離心機處於平衡的狀態。
- 將加速調至緩速(4 on a scale of 9)，減速設定調整至最低 (Zero Breaking)。
- 加速至450rpm，一到450rpm就立即減速。
- 將盤子反轉，加速至650rpm，一到650rpm就立即減速。

原廠細胞資料庫

目前全球已累積大量期刊發表，官網將這些資訊彙整為資料庫以供海馬用戶查詢參考，但由於同一細胞株於全球各地培養狀況仍有差異，因此建議仍須自行測試評估最佳上樣細胞數。

<https://www.agilent.com/search/?N=4294836537>

(左側可選擇搜尋條件)

The screenshot displays the Agilent website's search interface. At the top, there is a navigation bar with the Agilent logo and 'Trusted Answers' tagline. Below this is a search bar with a dropdown menu set to 'All' and a 'SEARCH' button. A navigation menu includes links for PRODUCTS, SOLUTIONS, TRAINING & EVENTS, SERVICES, SUPPORT, RESOURCES, and ORDER CENTER. The main content area shows search results for the 'Agilent Cell Analysis Publication Database'. A sidebar on the left allows for refining results by Research Area, Cell Type, Cell Line, Analysis Platform, Assay, Species, Journal, Primary Author, Language, and Publication Date. The search results show a list of publications, with one highlighted: 'Stroke gets in your eyes: stroke-induced retinal ischemia and the potential of stem cell therapy'. The publication details include the journal 'Neural Regen Res', publication date 'June 1, 2020', and author 'Kingsbury C, et al.'. A 'Download Results' button is visible at the top right of the results section. A red warning message is also present: 'To be enabled for e-commerce, you must first register. Agilent will then confirm your registration and inform you when your enablement is complete and you can begin transacting.'

Q1：樣本需前處理藥物 24 小時以上

若藥物處理會造成細胞數增加或減少，須評估在一開始有加藥與沒有加藥的條件需分別種多少細胞可於上機當天接近全滿；因此必須進行 Cell Density Test 以評估最佳上機細胞數。

若處理藥物會造成細胞大量死亡，建議降低藥物濃度進行實驗；因為細胞假如都死了或即將死亡的狀況下是幾乎沒有能量的。

Q2：樣本需轉染 (Transfection)

此類狀況通常需培養一天、轉染一天、回復一天，至少三天以上甚至更久；因此須評估一開始需種多少細胞可於上機當天接近全滿，必須進行 Cell Density Test 以評估最佳上機細胞數。

必須特別注意的是送入 Vector only 就會改變細胞的能量代謝，因此控制組為 Vector only 而非 wild type；而不同的 Vector 會造成能量代謝有不同的改變，因此必須是同樣的 Vector 條件下才可以互相比較。

Q3：樣本為幹細胞，需分化多天才可進行實驗

由於幹細胞通常須處在一定數量的細胞濃度之上，藉由彼此之間的交互作用才會進行分化；再加上大部分的人從未在如此小面積的狀況下分化細胞，因此不建議在海馬細胞盤上進行細胞分化實驗。

建議作法為在熟悉的細胞盤上分化細胞至實驗階段，再將細胞分至海馬細胞盤；分盤過程建議使用較溫和的 accutase 將細胞切下，以適量培養基打散細胞後，直接取適量體積細胞液移至海馬盤(需自行嘗試適當的體積，如此可避免離心造成的影響，像是油滴破裂)；貼附 overnight 後即可上機，此方式不需要重新嘗試新的分化條件，且幾乎維持細胞原本的狀態；若細胞貼盤狀態不佳，或是擔心 overnight 後細胞狀態改變，可視為懸浮性細胞黏附後直接上機。

4. 準備上樣用的培養基

細胞培養時請用平常使用的培養基

上樣用培養基直到上機前一小時才會更換，因此之前所有的準備過程請沿用過往實驗室的流程與培養基。

狀況一：實驗室平常用的培養基是 Powder 配製

海馬偵測糖解作用的原理是偵測單位時間微環境內 pH 值的下降速率，下降越快表示細胞越依賴糖解作用。平常培養時為了方便起見，會加入 Sodium Bicarbonate or HEPES 與 CO₂ 平衡讓培養基 pH 值穩定，所以可以長達三天才換一次培養基；但為了偵測糖解作用，必須將此緩衝成分 Sodium Bicarbonate or HEPES 移除。

請依平常流程使用 powder 配製培養基，但不要加入 sodium bicarbonate，其餘平常有加入的成分如 Sodium pyruvate, antibiotic 就請同樣加入，沒有加入就不須加入，讓此上機用的培養基與平常培養用的培養基越接近越好；但需注意 Glutamine 必須每次實驗新鮮加入 2mM，因為此胺基酸易分解半衰期短。

是否加入血清：若細胞在完全沒有血清的情況下不會受到影響，例如細胞型態改變等，則可完全不加入血清，若有影響請加入 2% 血清；不建議再提高血清濃度，因為當培養基含有血清，儀器於 mixing 的過程中有機率起泡，若氣泡黏附於螢光探針上會干擾偵測。

pH 請調整至 7.4，由於此培養基目前無緩衝成分所以非常敏感，在接近 7.4 時請改以 pipetman 操作，一次加入 5~10 uL，可避免重複來回調整。

最後培養基過 Filter 後，雖然 pH 值會些微改變，但影響不大可忽略。

狀況二：平常用的培養基是現成 Liquid

現成用的 Liquid 培養基一定內含 Sodium Bicarbonate or HEPES，所以並不建議使用。建議與購買培養基的廠商業務聯絡購買同級品的 powder 培養基配製，配製方法請見上一段描述。

平常用的培養基是特殊合成的

若平常使用的是特別製造的 Liquid 培養基，無法找到現成的 powder 培養基；建議與購買廠商詢問一些基本資訊後，購買並配製為類似的培養基；必須確認的基本資訊為此培養基的基底(ex: DMEM, MEM or RPMI)為何？Glucose, Sodium pyruvate, glutamine 等會直接供給能量代謝的基質濃度是多少？甚至其他可能會影響到能量代謝的成分如 insulin 也應該補上，以確保實驗用的培養基與平常培養用的在能量代謝上對細胞的影響是接近一致的。

若配合廠商無法提供此資訊，建議以期刊文獻與實驗室經驗準備差異不大的培養基進行實驗；因為在上機前一小時才會更換培養基，上機偵測時間約 2 小時，因此雖然培養基有些差異，但並不會有太大的影響，組別之間的差異仍會是一致的。

原廠提供的培養基

Agilent Seahorse 提供的培養基為針對海馬平台特別客製化的，內容物皆不含 glucose, pyruvate, glutamine & sodium bicarbonate 且已調整為 pH 7.4，實驗前需視需求加入所需基質，若為原廠基質，不須調整 pH；若非原廠需確認 pH 維持在 7.4



Part No	Product Name	Size
103680-100	Seahorse XF DMEM assay medium pack: includes XF DMEM medium, pH 7.4, 500 mL (103575-100), XF 1.0 M Glucose Solution, 50 mL (103577-100), XF 100 mM Pyruvate Solution, 50 mL (103578-100), and XF 200 mM Glutamine Solution, 50 mL (103579-100).	500 mL 50mL 50mL 50mL
103681-100	Seahorse XF RPMI assay medium pack: includes XF RPMI medium, pH 7.4, 500 mL (103575-100), XF 1.0 M Glucose Solution, 50 mL (103577-100), XF 100 mM Pyruvate Solution, 50 mL (103578-100), and XF 200 mM Glutamine Solution, 50 mL (103579-100)	500 mL 50mL 50mL 50mL
103575-100	XF DMEM Medium, pH 7.4	500 mL
103576-100	XF RPMI Medium, pH 7.4	500 mL

Glutamine 為易分解的胺基酸，半衰期約為一週，所以實驗室平常長期培養可使用 Glutamax，可避免細胞重複遭遇有或沒有 glutamine 的衝擊；但進行海馬實驗的培養基都必須新鮮加 2mM Glutamine，仍不建議使用 glutamax.

Glycolytic Rate Assay & Real-Time ATP Rate Assay

必須使用原廠已確認 Buffer Factor 的培養基。

5. 活化螢光探針組

螢光探針的特殊螢光材質平常為乾燥保存，在上機前一天需浸泡在校正液內，置於 37°C 無 CO₂ 的環境內 overnight 活化。

37°C 無 CO₂ 的環境可以是無 CO₂ 鋼瓶的培養箱、溫箱、雜交箱、甚至是養菌的培養箱皆可，切記勿讓校正液過度揮發使螢光材質乾掉，將螢光探針放回原本可避光的包裝盒，再將上方錫箔蓋子以實驗室膠帶封住即可。

於 utility plate 上 24 個 well 皆加入 **1mL** 校正液，中間放置粉紅色的 Hydro Booster 後再放上螢光探針；如此可確保螢光材料與環境中大氣充分的接觸，達到較好的活化效果；但上機校正時務必記得將此 Hydro Booster 移除。



↑ Day Before Assay ↑

↓ Day of Assay ↓

6. 更換上機用培養基

開始上機前一小時會將平常培養用的培養基更換為上機用的培養基，更換前務必先將培養基回溫到 37°C；更換完後將細胞放置於 37°C 無 CO₂ 的環境等待上機。

先於顯微鏡下確認細胞狀態

於顯微鏡下確認每個細胞的狀態，包含數量，均勻度以及型態；若細胞狀態不適合上機，建議中止實驗重新準備細胞；螢光探針原廠保證活化三天內若未使用，校正都是穩定的，等待上機前的這段時間須注意螢光探針須持續浸泡在校正液內，並且需要避光。

更換流程

使用 200p Pipetman，將 Tip 沿著牆壁降到 Well 底部，將培養用培養基完全吸起來，不可使用 Suction，因為力道太強；為了完全吸起來可以碰觸細胞盤底部的外圈，主要細胞偵測區域為中間，稍微碰觸造成細胞微量減少影響不大。

Wash，糖解作用相關實驗必須以 100 ul 上機用培養基 wash 一次，主要目的是洗掉 sodium bicarbonate；若主要偵測目標為粒線體，細胞又較為敏感脆弱可以不 Wash，但若細胞狀態允許，建議每次實驗都需要 wash。

最後加入 **675 uL** 上機用培養基，加入時不可直接衝擊細胞，須沿著上方斜坡緩緩流下。建議一次操作一個 Well，切勿讓細胞沒有培養基的時間過久，以免影響細胞。沒有細胞的 Blank Well 也以同樣流程處理。

7. 準備上機用的藥物

海馬具有自動注入藥物的功能，可依指定的時間與順序注入四次藥物。自動注藥的設計是將藥物儲存槽整合在螢光探針上，實驗前須先將準備注入的藥物正確配製並放在正確的位置，待上機後會與儀器內部的微流體通道結合，以高壓空氣將藥物推入。

配製藥物時須使用上機用的培養基稀釋，並將濃度調整為最終濃度的 10X 或是正確的倍數。

研究人員可以加入自己感興趣的藥物，若是使用原廠的

XF Mito Stress Test Kit

XF Glycolysis Stress Test Kit

請見下頁操作流程。

XF Mito Stress Test

Kit 打開來後內含六個錫箔袋，每袋都內含 Oligomycin, FCCP & Rotenone/Antimycin A。

使用方式：

一次用一袋

直接使用上機培養基回溶，使用方便，完全屏除 DMSO 可能對細胞的影響。

以下表體積配製藥物。

	Volume of Assay Medium	Final Concentration
Oligomycin	630 μ L	100 μ M
FCCP	720 μ L	100 μ M
Rotenone/ antimycin A	540 μ L	50 μ M

Oligomycin

為單純的抑制劑，建議 Final conc. 為 1 μ M。

FCCP

須測試最佳反應濃度，請參考後頁 [9. FCCP Titration Test](#)

Rotenone/Antimycin A

為單純的抑制劑，建議 Final conc. 為 0.5 μ M。

Glycolysis Stress Test

Kit 打開來後內含六個錫箔袋，每袋都內含 Oligomycin；另外含有六個藍色玻璃瓶內含 Glucose powder，以及六個綠色玻璃瓶內含 2-DG powder。

依下表體積，使用 **No Glucose** 培養基配製藥物

	Volume of Assay Medium	Final Stock Concentration
Glucose	3000 μ L	100 mM
Oligomycin	720 μ L	100 μ M
2-DG	3000 μ L	500 mM

Glucose

建議 Final conc. 為 10 mM；直接放入注藥槽藉由自動注藥進行 10X 稀釋即可。若 Glucose 為自己實驗室準備，濃度不建議超過 10 mM，因為濃度過高時 2-DG 會無法有效抑制。

Oligomycin

為單純的抑制劑，建議 Final conc. 為 1 μ M。

2-DG

全名為 2-Deoxy Glucose 為 Glucose 的類似物，是以競爭性的方式抑制細胞使用 Glucose；原廠建議 Final conc. 為 50 mM，但此濃度越高抑制效果越好，所以可以考慮將原本的 3000 μ L 改為 2000 μ L，以提高 2-DG final conc. 至 75 mM，實驗效果會更好。

XF Dilution Calculation

藥物配製需注意濃度是否正確：

1. Stock conc.：若藥物以 DMSO 配製並儲存，就會有濃度較高的 stock.
2. 10x conc.：放入海馬自動注藥槽的藥物濃度，通常為最終濃度的 10 倍.
3. Final conc.：隨著儀器自動運作，將藥物以高壓空氣推入細胞盤內後，最終被稀釋接觸細胞的濃度.

計算方式：

FINAL Conc. (藥物最終濃度) x 10 (稀釋倍數) x VOL TO PREPARE (需要製備體積)
= STOCK (藥物保存濃度) x VOL STOCK SOLUTION (從 Stock 取多少體積的藥物)

範例：配製 Oligomycin

FINAL Conc. (1 uM) x 10 (稀釋倍數) x VOL TO PREPARE (1600 uL > 75*20, 多配一些)
= STOCK (0.5 mM, DMSO 回溶) x VOL STOCK SOLUTION

因此 VOL STOCK SOLUTION = 32 uL

取 32 uL stock oligomycin 到 1568 uL 上機用培養基

8. 將藥物放置在藥物注入槽內

放置在注藥槽內的藥物必須要用上機用培養基稀釋，並注意藥物的 pH 值不可過酸或過鹼；注藥的方式可分為濃度固定與體積固定兩種，視方便或精準任意選擇，起始體積可以更改，但必須大於 500uL。

藥物濃度固定 起始體積 675uL			藥物體積固定 起始體積 675uL		
Port	Vol.	Conc.	Port	Vol.	Conc.
A	75 uL	10X	A	75 uL	10X
B	85 uL	10X	B	75 uL	11X
C	95 uL	10X	C	75 uL	12X
D	100 uL	10X	D	75 uL	13X



放入藥物前請確認螢光探針的方向是正確的，盤子的缺角應在左下方，左側由上到下為 ABCD，上側由左到右為 123456。放入藥物時，將 Tip 斜斜插入沿牆壁注入，勿直接衝擊正下方，避免藥物從孔洞流失；過程中若產生氣泡並不影響藥物注入。

由於自動注藥系統的設計是連通管的原理，所以藥物的擺放需注意：

狀況一：

A port, 一半 well 有放藥，另一半 well 不須處理藥物就必須加入同樣體積的培養基，連通管的壓力才會一致，若有半邊完全空著，氣壓會優先從此處跑掉，導致有藥物的部分可能因壓力不足而無法完全注入。

狀況二：

進行粒線體壓力測試，ABC 三個 ports 都滿了；D port 因為全部都沒有加藥，所以 D port 可以完全空著。

Blank well 的加藥槽需補入同體積的培養基。

9. FCCP Titration Test

若欲進行粒線體壓力測試，強烈建議先測試最佳 FCCP 濃度。

FCCP 會造成粒線體內膜壓力讓 proton 可直接回流至 matrix，此藥物對粒線體耗氧的效果是鐘形曲線，原因如下：

Low FCCP conc.

Proton 回流量低，粒線體耗氧上升有限。

Best FCCP conc.

粒線體內膜完整性與 proton 最大回流量達最佳平衡，耗氧可達最大值。

High FCCP conc.

濃度過高時會破壞粒線體內膜的電子傳遞鏈供應，粒線體耗氧下降，因此不是 FCCP 濃度越高越好。

建議實驗設計步驟如下：

1. 選擇你的組別：

- 只有一個控制組：再挑選一個最感興趣的實驗組，共兩個條件各 seeding 10 個 well.
- 有兩個控制組：各 seeding 10 個 well.

	1	2	3	4	5	6
A	Control (Black)	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
B	Blue	Blue	Blue	Control (Black)	Blue	Blue
C	Green	Green	Control (Black)	Green	Green	Green
D	Green	Green	Green	Green	Green	Control (Black)

2. 設定 FCCP final conc. 測試範圍


- 非癌細胞株
4, 2, 1, 0.5 & 0.25 uM
- 癌細胞株
2, 1, 0.5, 0.25 & 0.125 uM
以上各兩重複

由於癌細胞通常粒線體狀態較差，所以需下修測試濃度範圍。

	1	2	3	4	5	6
A	Control (Black)	Blue	Green	Purple	Yellow	Red
B	Blue	Green	Purple	Control (Black)	Yellow	Red
C	Cyan	Magenta	Control (Black)	Yellow-Green	Brown	Purple
D	Cyan	Magenta	Yellow-Green	Brown	Purple	Control (Black)

10. 上機與軟體操作

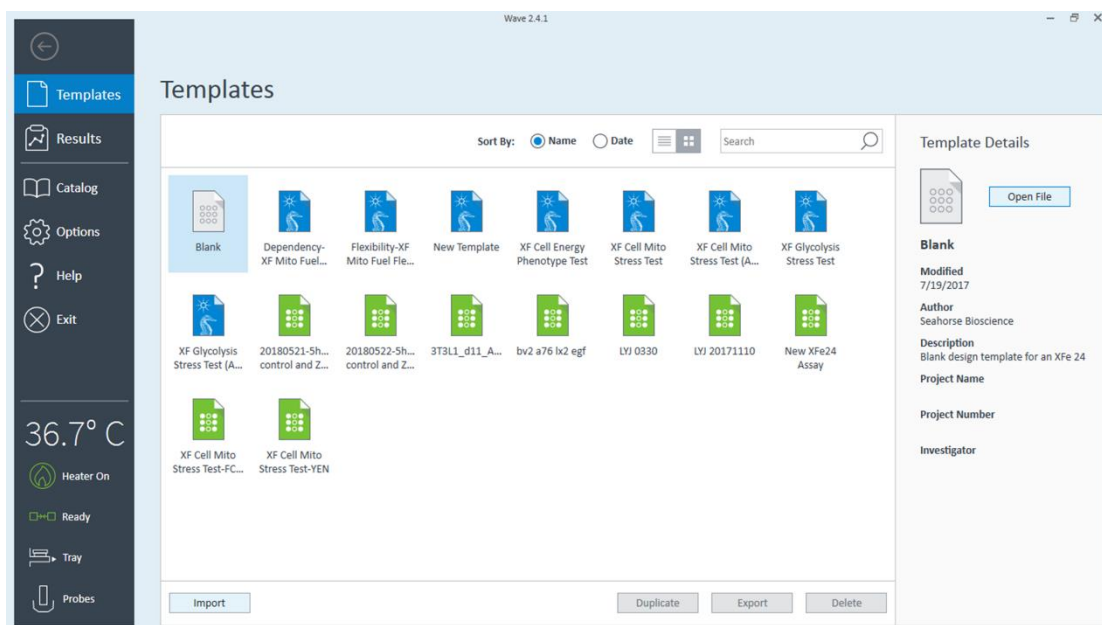
上機前務必將儀器升溫至 37°C，可於前一天就開機預熱 Overnight；或至少開機預熱一小時後才開始進行實驗。

開啟 Wave Software  會自動開始與儀器連結校準。
畫面如下：在機器自動校準約一分鐘後，左下狀態列會顯示 Ready，並開始升溫到 37°C。

此時於 Template 有幾個實驗設計可以選擇：

1. Blank：從頭開始撰寫 template
2. 選擇原廠內建的 template：例如 XF Cell Mito Stress Test Kit，已設定好儀器的 protocol 與基本資訊，使用者只需調整組別數量與位置即可。
3. 選擇自己使用過的 template：使用者可將固定會使用的 template 儲存起來，以供自己專用。

選擇好以上任一個選項後，點選右方 **"open file"** 開始進一步的設定。
以下以選擇 Blank 為例：



Group Definitions

Definitions

使用者可將實驗細節紀錄下來，像是在撰寫電子版的實驗紀錄簿，若不撰寫或是撰寫錯誤也不會影響實驗的流程與結果。

Injection strategies：注藥順序、藥物種類、溶劑與濃度等。

Pretreatments：可輸入文字描述前處理的細節。

Assay Media：種類、來源、誰準備的、有哪些成分與 pH 值。

Cell Type：種類、來源、數量、誰準備的與細胞代數。

Groups

已內建 Background group，可按下”Add Group”增加組別；此環節也可於 Plate Map 操作，請見下頁。

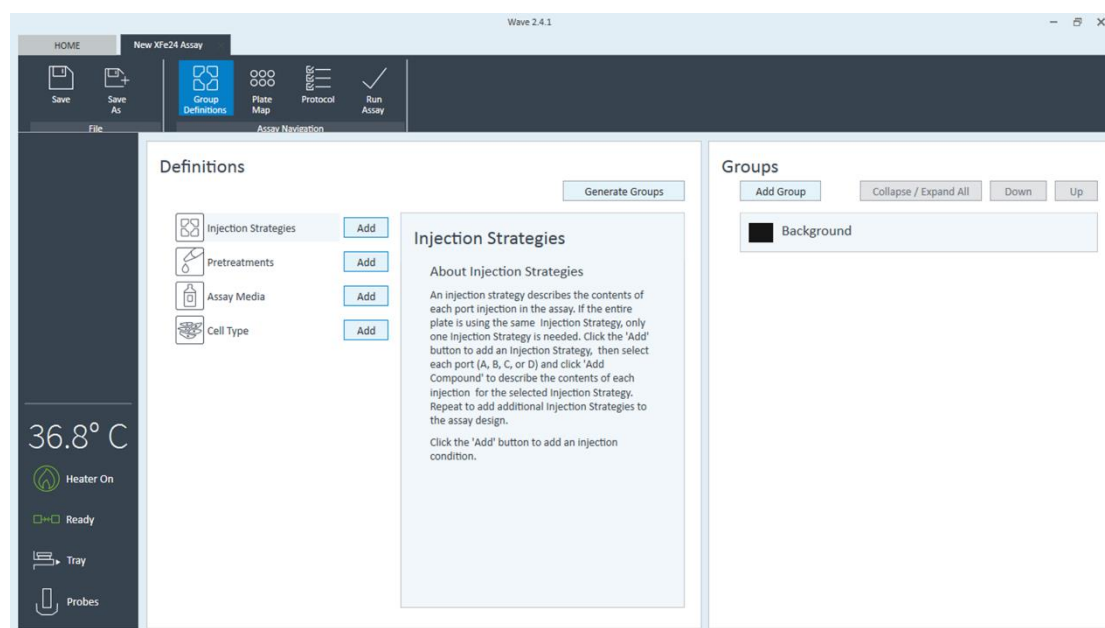


Plate Map

Groups

按下 Add Groups 增加組別，下圖以 FCCP Titration Test 為例，共有十個組別，分別為控制組 FCCP 4~0.25 uM 與實驗組 FCCP 4~0.25 uM，每一組都可任意更改顏色。

Plate Map

先點選左邊的組別，然後點選右方 24 well 的相對位置。

(此範例為 10 個組別測試 FCCP 濃度各兩重複，但一般實驗不建議低於三重複，若是較脆弱敏感的細胞如 primary cell 建議再提高重複數)

Background 內建位置為 A1, B4, C3 & D6；若 background well 於 seeding cells 有錯誤，可於此階段更改位置，不需要重新種一盤細胞。

The screenshot displays the Wave 2.4.1 software interface for configuring a 24-well plate map. The interface is divided into several sections:

- Top Bar:** Includes 'HOME', 'New XFe24 Assay', and 'Wave 2.4.1'. The 'Assay Navigation' menu is active, showing options for 'File', 'Group Definitions', 'Plate Map', 'Protocol', and 'Run Assay'.
- Groups Panel (Left):** Contains a list of ten groups with their respective colors and a 'Background' group (black). The groups are:
 - Background (Black)
 - CTL F4 (Blue)
 - CTL F2 (Green)
 - CTL F1 (Purple)
 - CTL F0.5 (Yellow)
 - CTL F0.25 (Red)
 - Exp F4 (Cyan)
 - Exp F2 (Magenta)
 - Exp F1 (Lime Green)
- Plate Map Panel (Right):** Shows a 4x6 grid of wells (A1-D6). The wells are colored according to the groups assigned in the left panel. The background wells (A1, B4, C3, D6) are black. The experimental wells are colored: A2 (Blue), A3 (Green), A4 (Purple), A5 (Yellow), A6 (Red), B1 (Cyan), B2 (Magenta), B3 (Black), B5 (Yellow), B6 (Red), C1 (Cyan), C2 (Magenta), C4 (Lime Green), C5 (Brown), C6 (Purple), D1 (Cyan), D2 (Magenta), D3 (Lime Green), D4 (Brown), D5 (Purple), D6 (Black).

Protocol

Calibrate：每次實驗必須要做的動作，無法更改。

Equilibrate：平衡樣本與環境的指令，建議勾選。

Mix-Wait-Measure：已內建設定好，若無特殊需求就不需要更改調整；可按上下箭頭增加或減少 Cycle 數，或直接輸入指定的次數。

Injection：點擊 Injection 一次就會注入一次藥，可點擊 ABCD 指定注藥的位置或同時注入亦可，上方可輸入藥物的名稱。

每個階段上方會顯示所需要花費的時間，右上方則會顯示實驗總共需要的時間；此時間不包含 Calibration，是從細胞放入儀器內到實驗結束需要的時間。

Run Assay

在此頁面左方您可檢視實驗的設定資訊。

Start Run :

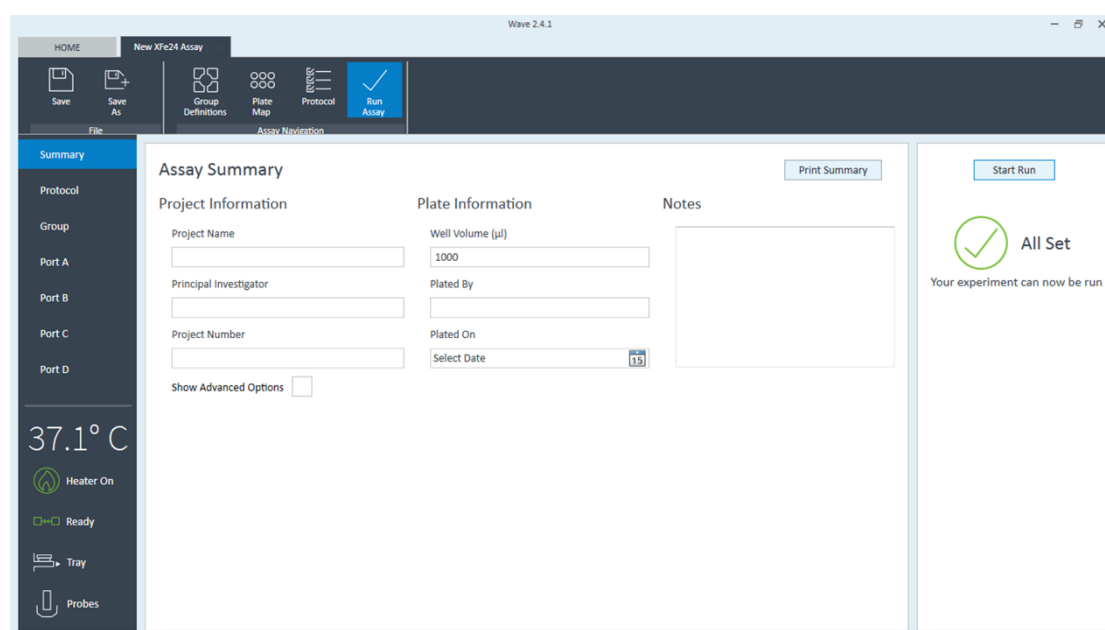
確認無問題就可點擊右方 Start Run 開始實驗。

開始實驗

點擊 Start Run 之後，會跳出視窗供使用者選擇儲存位置並命名檔案名稱；接著點擊確定後儀器內托盤就會退出。

放置時注意方向性，條碼向後，缺口朝自己及儀器前方；移除蓋子與粉紅色的 Hydro booster，只留下裝校正液的 utility plate 與上方綠色的螢光探針，按 Continue 讓探針進入儀器開始實驗。

校正需約 20 min；校正完成後您人在現場按下一步才會將校正盤退出，將校正盤替換為要上樣的細胞盤並送入儀器開始實驗，接下來儀器會自動操作到實驗結束，您可在實驗結束後再來收拾樣本並儲存 Data 回去分析。



11. 數據分析

下載離線軟體 (皆需註冊)

若使用的電腦為 PC, 可至官網下載免費離線分析軟體 Wave

<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/wave-desktop-2-6>

若使用的電腦為 MAC, 可使用雲端線上分析軟體(PC 也可使用)

<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/seahorse-analytics>

數據分析

離線分析軟體可參考 Wave 2.6 User Guide

https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/S7894-10000_Rev_C_Wave_2_6_User_Guide.pdf

雲端分析軟體可按右上角 Help 了解進一步資訊.