

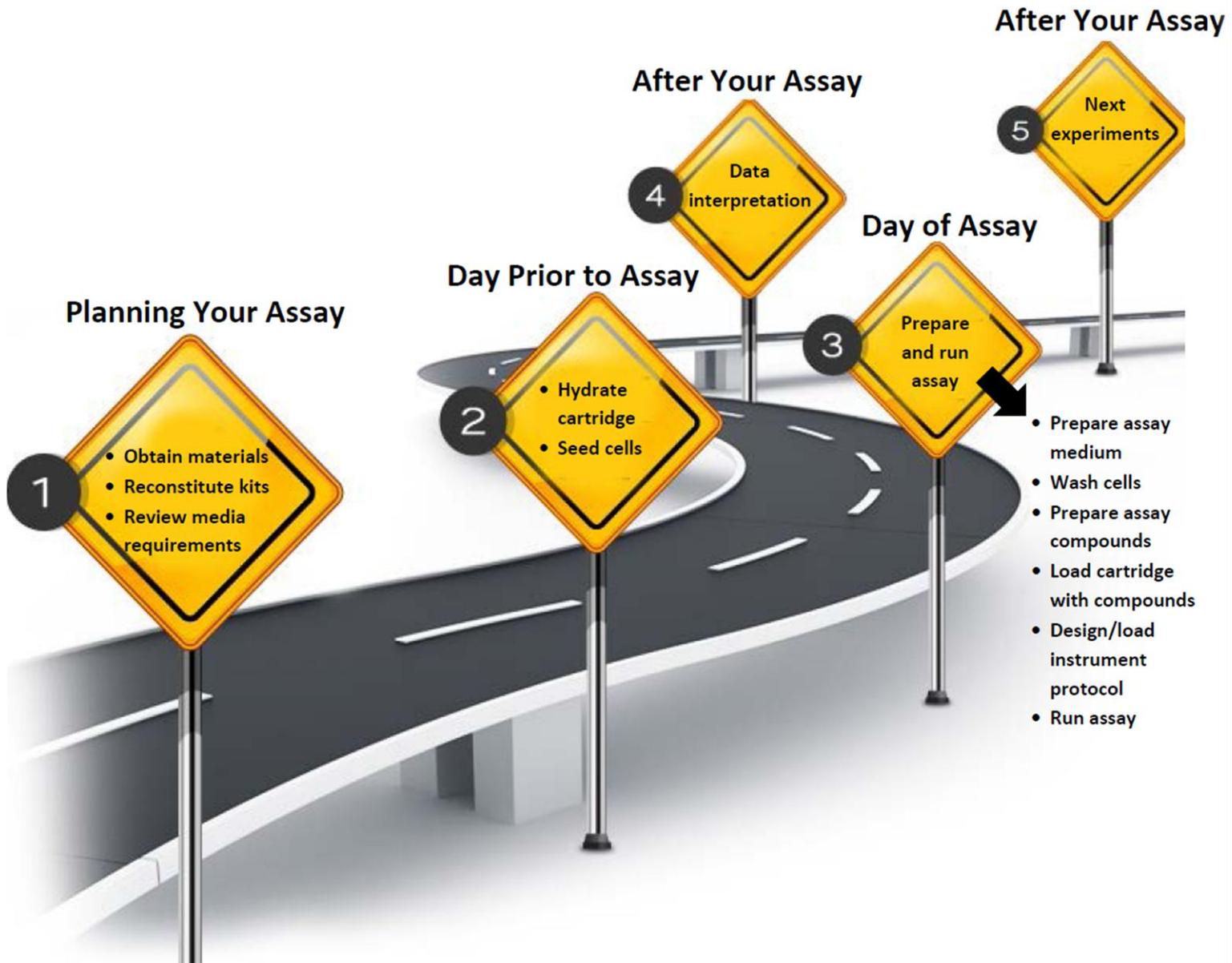
海馬生物能量測定儀 操作手冊



目錄

XF Assay Roadmap	3
1. 確認海馬的使用機型	4
2. 購買正確的海馬耗材	5
3. 選擇您的加藥試驗	6
a. Mito Stress Test	
b. Glycolysis Stress Test	
c. Fatty Acid Oxidation	
d. Complex protein Activity & Substrate Utilization	
4. 準備上樣用的細胞	10
5. 準備上樣用的培養基	16
6. 活化螢光探針組	19
Day Before Assay	
<hr/>	
Day of Assay	
7. 更換上機用培養基	20
8. 準備上機用的藥物	22
9. 將藥物放置在注藥槽內	25
10. 上機與軟體操作	27

XF Assay Roadmap



1. 確認您使用的海馬機型

XF24



XF96



XFe24



XFe96



XFp



2. 購買正確的海馬耗材

FluxPak Series：內含細胞培養盤，螢光探針 & 校正液

XF24：XF24 FluxPak

XF96：XF96 FluxPak

XF24：XF24 FluxPak

XF96：XF96 FluxPak

XFp：XFp FluxPak



XF FluxPaks



XFp

XFp FluxPaks



XF24 Islet FluxPak

適用 XF24 & XF24 only

分析活體組織與小型生物樣本



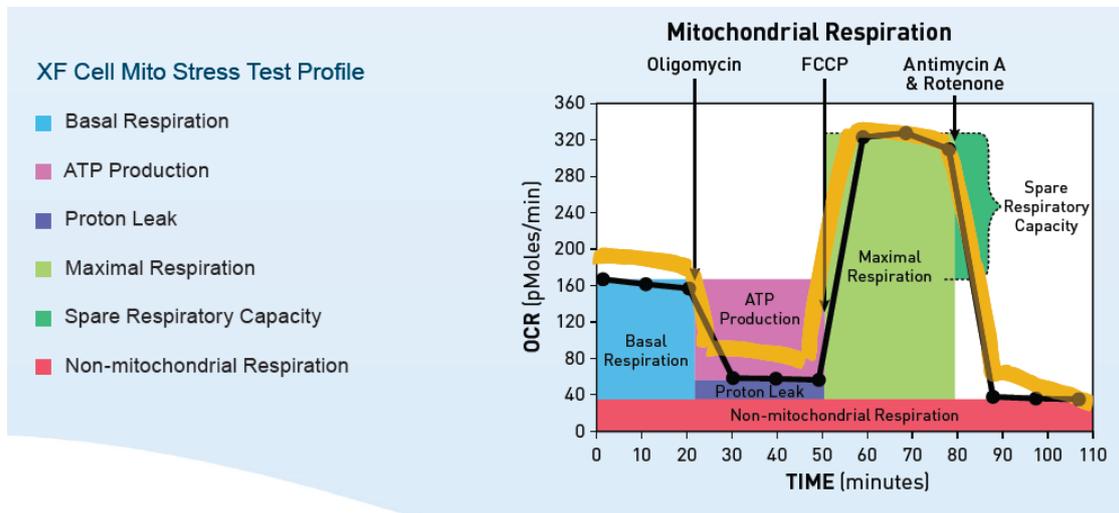
XF96 Spheroid FluxPak

適用 XF96 only

分析單一 sphere 樣本

3. 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

適用 XF24, XF96, XFe24 & XFe96

XFp cell mito stress test kit

適用 XFp only

皆內含 Oligomycin, FCCP(須測試最佳濃度),
Rotenone/Antimycin A

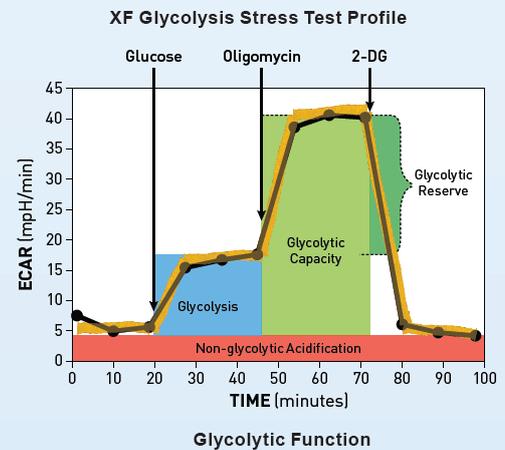
(依使用方式，可進行 6~10 盤實驗)



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

適用 XF24, XF96, XFe24 & XFe96

XFp glycolysis stress test kit

適用 XFp only

皆內含 glucose, oligomycin & 2-DG

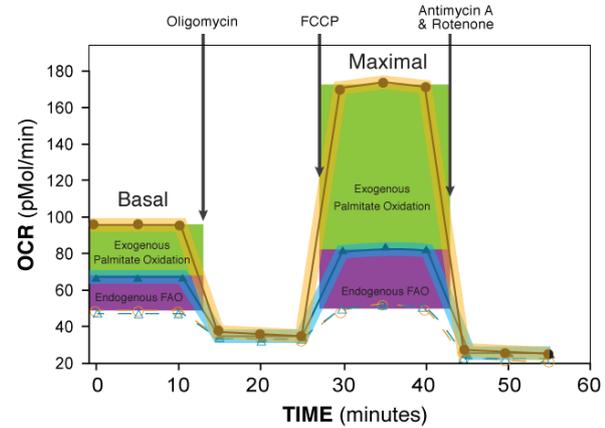
(可進行 6 盤實驗)



C. Fatty Acid Oxidation : 評估脂肪代謝能力

此實驗以 Mito Stress Test 為基礎，配合 BSA-conjugated Palmitate 和抑制劑 etomoxir 來評估細胞內源性脂肪代謝的比例，以及可承受外來脂肪的代謝極限的程度是多少。

此實驗難度較高，不建議初次進行海馬實驗人員操作。



對應藥物組：

XF Palmitate-BSA FAO Substrate

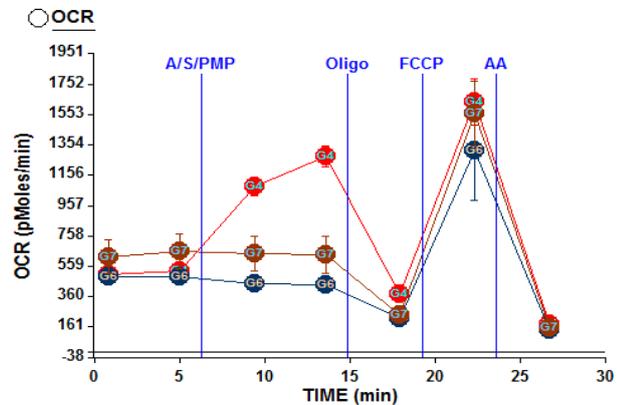
適用 XF24, XF96, XFe24 & XFe96

內含 BSA & BSA-conjugated Palmitate
(可進行 3 盤實驗)



D. 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

適用 XF24, XF96, XFe24, XFe96 & XFp

內含一管 PMP

(可進行約 10 盤以上實驗，依細胞種類而有所不同)



4. 準備上樣用的細胞

上樣時細胞數須為單層全滿

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，如此每次偵測到的細胞數才是固定的，因此若為懸浮性細胞則需黏附上去；若偵測時偵測細胞數過少可能會偵測不到訊號，若細胞數過多則可能會因細胞間的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為最佳。

XF24 & XFe24

確認培養細胞數量

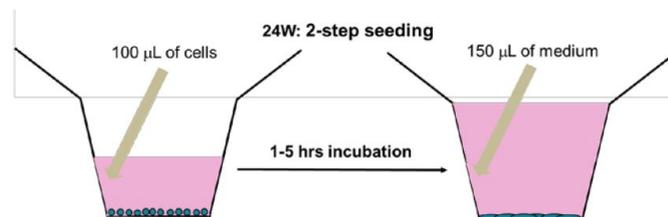
細胞培養盤底面積為 0.275cm^2 ，與傳統 96 well plate 大小近似，為了確保上機時可得到足夠的訊號，建議上機時細胞數需接近全滿幾乎無空隙；所以必須先確認種多少細胞數於上機時可接近全滿，因此請先以實驗室 96 well plate 進行測試，(大部分的細胞約是 2 萬顆~4 萬顆/well)

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，因為溫度與溶氧量的高低有切的關係。

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 μL 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 μL 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。



XF96, XFe96 & XFp

確認培養細胞數量

細胞培養盤底面積為 0.106 cm^2 ，介於 96 & 384 well plate 之間。為了確保上機時可得到足夠的訊號，建議上機時細胞數需接近全滿幾乎無空隙，因此需先使用一個細胞培養盤測試 cell density；在顯微鏡下評估多少細胞數於上機當天會接近全滿。

(大部分的細胞約是 0.8 萬顆~1.6 萬顆/well)

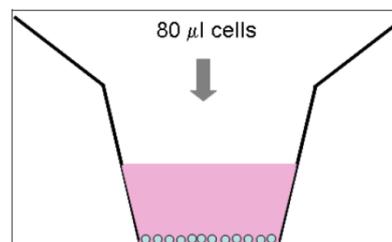
將 Blank Well 空下來

XF96 & XFe96 用戶請將 **A1,A12,H1,H12** 空下來，不種細胞只補培養基，作為上機溫度背景校正，因為溫度與溶氧量的高低有切的關係。

XFp 用戶請將 **A & H** 空下來，不種細胞只補培養基，作為上機溫度背景校正。

Cell Seeding

實驗前一天將確定的細胞數懸浮在 80 μ L 平常培養用的培養基內，直接注入培養盤底部後放入培養箱內，隔天即可進行實驗；由於底面積小，沒有分布不均勻的問題。



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 必須非常薄，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. NaHCO_3 (Sigma, S5761)
取420mg NaHCO_3 溶於50ml 滅菌水中，調整pH值至8.0，以0.22 μm 濾網過濾後存放於4°C備用，此為0.1M之 NaHCO_3 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3.5 μg 。
以2.54 MG/ML包裝為例進行下列計算：
XF24：取13 μL Cell-Tak原液加入1.5ml的 NaHCO_3 溶液中；每個well加入50 μL 。
XF96：取17 μL Cell-Tak原液加入2.0ml的 NaHCO_3 溶液中；每個well加入20 μL 。
XFp：取1.5 μL Cell-Tak原液加入150 μL 的 NaHCO_3 溶液中；每個well加入20 μL 。
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2次水(XF24加入200 μL , XF96 & XFp加入100 μL)後再移除以去除殘留的 NaHCO_3 ，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，因為若溫度於37°C cell-tak黏性會下降。
將準備要黏附的細胞數置於上機用的培養基內(XF24置於100uL內，XF96 & XFp置於50uL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至指定體積(XF24捕到500uL，XF96 & XFp捕到180uL)，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，可嘗試於細胞加入後將盤子離心，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。

<http://www.seahorsebio.com/learning/cell-line.php>

Cell Type: Please select one ▼	Research Area: Please select one ▼
XF Assay: Please select one ▼	Author: <input type="text"/>
<input type="button" value="Search"/> ↓ Search by Cell Line	
Reset Fields	

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，因此如何評估最佳的細胞數難度較高。

實驗人員須先評估在一開始種多少細胞，細胞分化的結果與您過往的經驗是一致的；但通常會發現細胞數有過滿的情形，因此須進一步評估細胞數可減少到何種程度時，細胞分化的結果與您過往的經驗仍是一致的。

假如偵測時細胞數過多，會在短時間內就消耗完微環境內氧氣造成低氧的狀況對細胞造成壓力；同時過多的細胞一同產酸也會造成微環境 pH 降低過多導致細胞壓力，因此偵測到的能量代謝資訊極有可能是不真實的；因此必須正確評估一開始種多少細胞可成功分化又不至於於偵測時過滿是非常重要的。

5. 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，因此之前的所有準備過程請沿用過往實驗室的流程與培養基。

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, glutamine, 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。

血清加入 2%即可，因為血清內大量的 Albumin 同樣有良好的 pH 緩衝效果；而保留 2% 不完全移除的原因為某些細胞在完全沒有血清的情況下會有嚴重的影響，例如型態改變等；但實驗室若真對此細胞進行過無血清的 Starvation 並無觀察到有影響，則完全移除血清亦可。

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。

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

XF Base Medium

DMEM, no glucose, no sodium bicarbonate & HEPES; pH 7.4; 1L

XF Assay Medium

DMEM, no glucose, 2mM GlutaMAX, no sodium bicarbonate & HEPES; pH 7.4; 1L



Components	XF Base Medium	XF Assay Medium
Mg ²⁺ (as MgSO ₄)	0.8 mM	0.8 mM
Ca ²⁺ (as CaCl ₂)	1.8 mM	1.8 mM
NaCl	143 mM	143 mM
KCl	5.4 mM	5.4 mM
NaH ₂ PO ₄	0.19 mM	0.19 mM
L-Ala-Gln (GlutaMAX)	0.0 mM	2.0 mM
Phenol Red	3 mg/L	3 mg/L
L-glutamine	0 mM	0 mM
Glucose	0 mM	0 mM
Sodium Pyruvate	0 mM	0 mM
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	0 mM	0 mM

6. 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，建議封上 parafilm 遠離風扇放置較佳。

XF24

於 Utility plate 上 24 個 well 皆加入 **1mL** 校正液，放置在 37°C 無 CO₂ 的環境 overnight 即可。

XFe24

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。

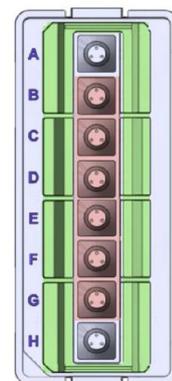


XF96 & XFe96

於 Utility plate 上 96 個 well 皆加入 **200 uL** 校正液，放置在 37°C 無 CO₂ 的環境 overnight 即可。

XFp

於 Utility plate 上 8 個 well 皆加入 **200 uL** 校正液，並在左右兩邊的四個凹槽都分別注入 **400 uL** 校正液後，放置在 37°C 無 CO₂ 的環境 overnight 即可。



7. 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。

XF24 & XFe24

使用 1000p 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；吸起來之後不須 Wash，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。

建議一次操作一個到數個 Well，切勿讓細胞沒有培養機的時間過久，以免影響細胞。沒有細胞的 Blank Well 也以同樣流程處理。

XF96, XFe96 & XFp

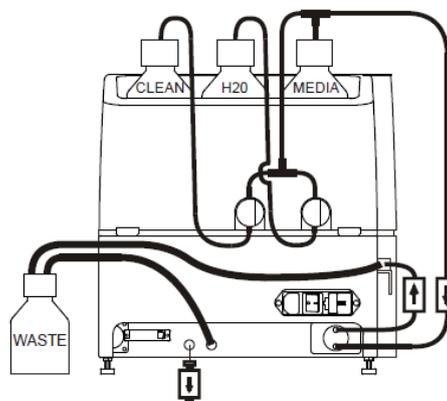
使用 200p Pipetman，將 Tip 沿著牆壁降到 Well 底部，將培養用培養基完全吸起來，不可使用 Suction，因為力道太強；吸起來之後不須 Wash，加入 **180 uL** 上機用培養基，加入時不可直接衝擊細胞，須沿著上方斜坡緩緩流下。

建議一次操作一個到數個 Well，切勿讓細胞沒有培養機的時間過久，以免影響細胞。沒有細胞的 Blank Well 也以同樣流程處理。

使用 Prep Station 更換培養基

準備 200mL 以上的上機用培養基，並確實回溫到 37°C；將 Prep Station 開機回溫到 37°C，將放置 Media 的罐子以培養基潤洗過後，加入 200mL 以上的培養基，並確認二次水及 70%酒精也有 200mL 以上。

開啟桌面 Prep Station 軟體，選擇 Media change 分頁，確認 Do Prime & Do Rinse 皆亮綠燈、Final Volume 為 180 μ L、注入 Columns 為 All，接著放入細胞培養盤(A1, H1 的方向朝內)，將細胞盤蓋子移除，按下 Start 即會自動更換培養基；整個過程會更換兩次，所以中間會稍微停頓，此時請勿將培養盤移除；待整個過程結束後，即可將細胞培養盤取出，放入 37°C 不含 CO₂ 的 Prep Station 內，靜置一個小時後上機。



實驗結束後，請將放置 Media 的罐子清洗完畢，加入 200mL 以上的二次水，並放入清洗用的盤子，進行一次更換培養基的流程以清洗管路。

8. 準備上機用的藥物

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。

使用方式有兩種：

1. 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；因此準備 10 μ M 放入注藥槽。

FCCP

須測試最佳反應濃度，建議測試 Final conc. 為 4, 2, 1, 0.5, 0.25 μ M，以控制組最大反應的濃度做為未來實驗的標準濃度，記得須為 Final conc. 10 倍濃度放入注藥槽。

Rotenone/Antimycin A

為單純的抑制劑，建議 Final conc. 為 0.5 μ M；因此準備 5 μ M 放入注藥槽。

2. 需要多少用多少

使用 DMOS 回溶，可重複冷凍解凍使用，在一系列的稀釋後僅存微量濃度，對細胞影響不大。

Oligomycin, FCCP & Rotenone/Antimycin A 分別取 126, 144, 54 μ L DMS 回溶，此三管藥物便皆為 0.5 mM Stock。實驗時以上機用培養基稀釋到 Final Conc. 的 10 倍濃度放置到注藥槽內即可，相關建議濃度請見上列敘述。

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。

Oligomycin

為單純的抑制劑，建議 Final conc. 為 1 μ M；因此準備 10 μ M 放入注藥槽。

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；建議 Final conc. 為 50 mM；因此直接放入注藥槽藉由自動注藥進行 10X 稀釋即可。

Seahorse Stress Test Dilution Calculator APP

Seahorse Bioscience 提供一個簡易計算稀釋藥物的 APP。

只需依序輸入：

- FINAL WELL (藥物最終濃度)
- PORT (稀釋倍數)
- STOCK (藥物保存濃度)
- VOL TO PREPARE (需要製備體積)

就會自動計算出

- VOL STOCK SOLUTION
(從 Stock 取多少體積的藥物)
- VOL ASSAY MEDIUM
(加入到多少體積的上機用培養基)



現在就下載！讓做實驗的你不需要再為數字煩心！

直接搜尋 Seahorse Bioscience APP 就可以找到了。

Google Play

<https://play.google.com/store/apps/details?id=air.com.seahorsebio.calculator&hl=en>

iTunes

<https://itunes.apple.com/us/artist/seahorse-bioscience/id956653634>

9. 將藥物放置在藥物注入槽內

海馬將自動注藥系統整合在螢光探針上，在實驗前研究人員將正確的藥物濃度放在正確的藥物注藥槽內，就可用軟體控制在指定的時間依指定的順序將藥物注入，最多可注入四次藥物。

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；放入的藥物濃度為 Final conc. 的 10 倍，放入體積請見下述說明；沒有加入藥物的 Well 其注藥槽必須要補入同體積的上機用培養基。

XF24 & XFe24

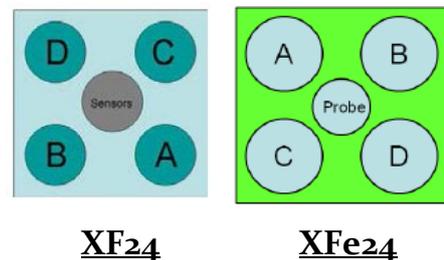
上機起始培養基體積為 675uL，之後放入注藥槽內的體積依注入順序分別為 **75 uL, 85 uL, 95 uL & 100 uL**，依此流程注入的藥物都會被稀釋 10 倍。放入藥物前請確認螢光探針的方向是正確的，盤子的缺角應在左下方，左側由上到下為 ABCD，上側由左到右為 123456。

XF24 放置藥物的順序

A：右下角 B：左下角 C：右上角 D：左上角

XFe24 放置藥物的順序

A：左上角 B：右上角 C：左下角 D：右下角



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。

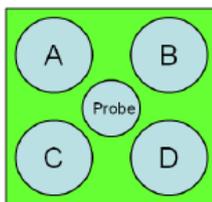
XF96, XFe96 & XFp

上機起始培養基體積為 180 μ L，之後放入注藥槽內的體積依注入順序分別為 20 μ L, 22 μ L, 25 μ L & 27 μ L，依此流程注入的藥物都會被稀釋 10 倍。

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 ABCDEFGH，上側由左到右為 123456789101112。

放置藥物的順序皆相同

A：右下角 B：左下角 C：右上角 D：左上角

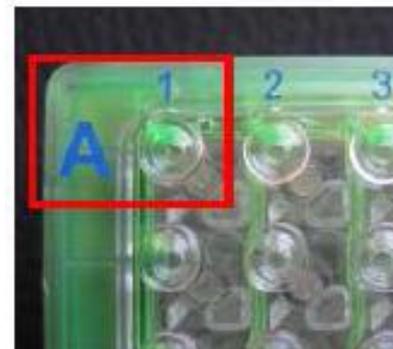


XF96, XFe96 & XFp

XF96 & XFe96 放入藥物時務必使用注藥輔助盤，注入時 Tip 須與輔助盤垂直後將藥物注入，以確保藥物儀器自動注藥時不會殘留在管壁上。

Constant Concentration Starting well volume: 180 μ L assay medium

Vol.	Conc.
20 μ L	10X
22 μ L	10X
25 μ L	10X
27 μ L	10X



10. 上機與軟體操作

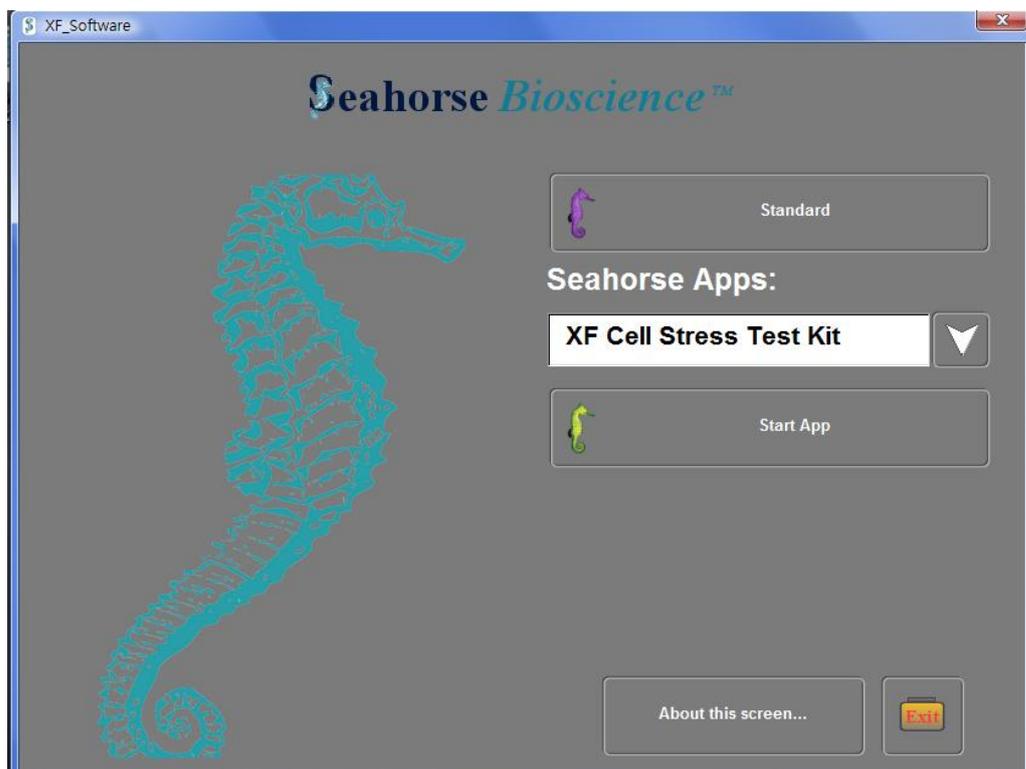
上機前務必將儀器升溫至 37°C，建議於前一天就開機預熱 Overnight；或至少開機預熱兩小時後才開始進行實驗。

XF24 & XF96

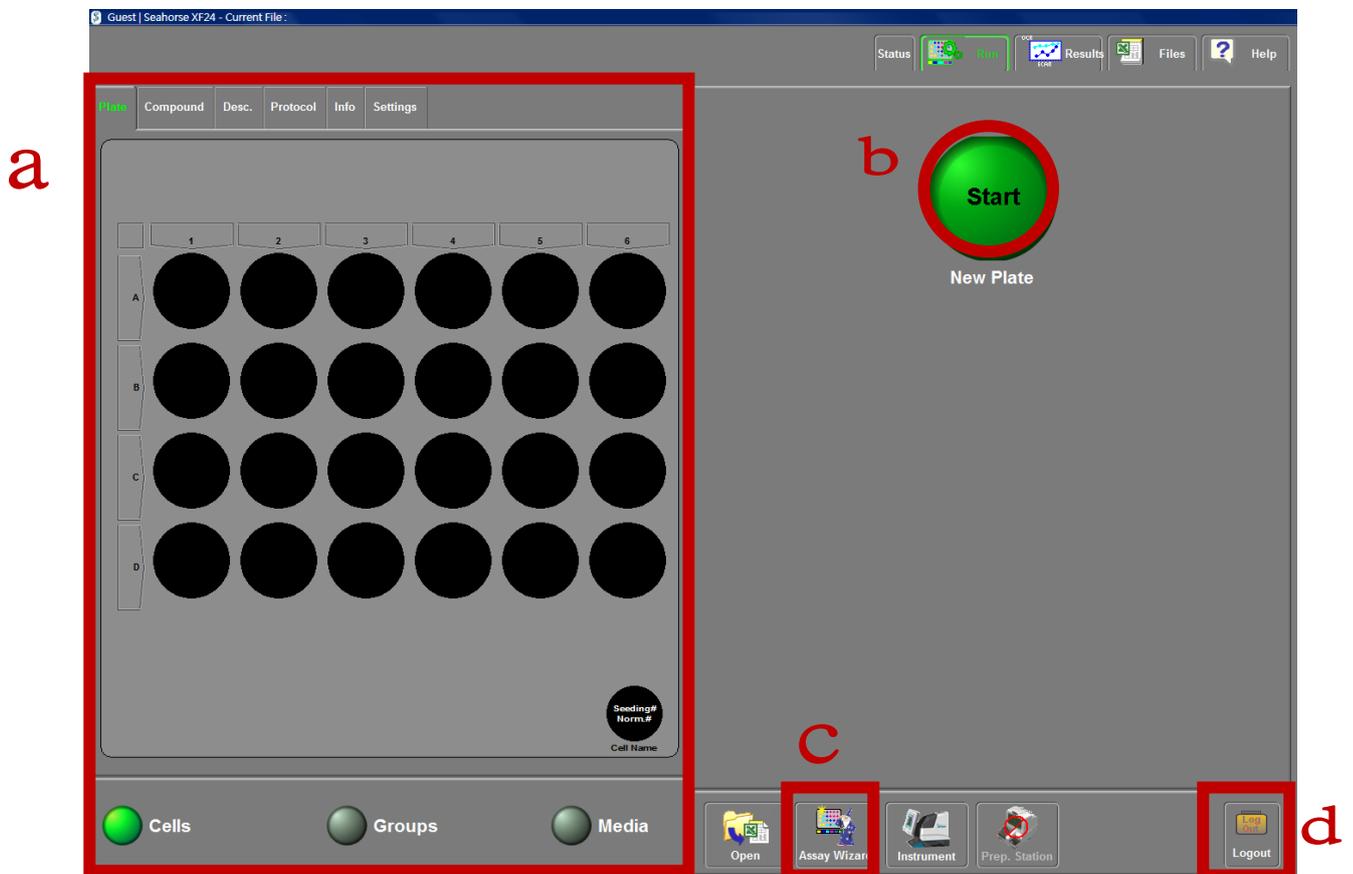


Software

1. 開啟 Seahorse XF24 or 96
2. 點擊 Standard 進入，此時軟體會開始於儀器連線並開始升溫



3. 點擊 Seahorse Guest 進入操作頁面



- a. 此部分於剛開啟時會顯示前一個人的實驗設定，當現在的使用者更改內容後此處的顯示也會改變；實驗前務必於此處確認實驗設定是正確的。
- b. Start：點擊此處開始實驗
- c. Assay Wizard：進行實驗設定的操作
- d. Logout：離開軟體

實驗前設定

開啟 Assay Wizard

General	Cells	Media & PPR	Compounds	Back. Correction	Groups & Labels	Protocol	Display	End
Project Information:								Notes:
Assay Name:	No Name							
Project Name:								
Project Number:								
Principal Investigator:								
Instrument Operator:								
Department:								
Result File Name:								

紀錄性的部分：

實驗人員可對以下部分作紀錄，此紀錄會與檔案綁定在一起，可確保不會遺失或忘記當初的實驗條件與設計。所以此部分的資訊不填寫或填寫錯誤都不會影響實驗進行。

General：紀錄實驗室主持人與操作人員等基本資訊；此頁面可點選 Lord from Template 開啟已在離線電腦設定好的 Template 或之前實驗的 Data 設定作為實驗設定。

Cells：紀錄上機時使用的細胞種類、數量與位置等資訊。

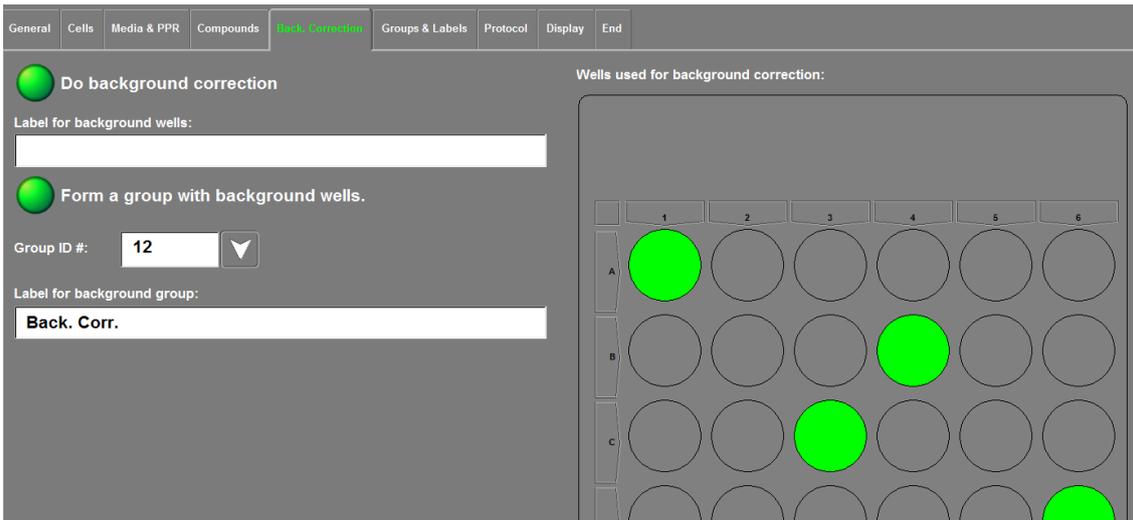
Media & PPR：紀錄上機所使用 medium 的成分與位置等資訊。

Compounds：紀錄自動注入藥物的種類、濃度與位置等資訊。

儀器連動的部分：

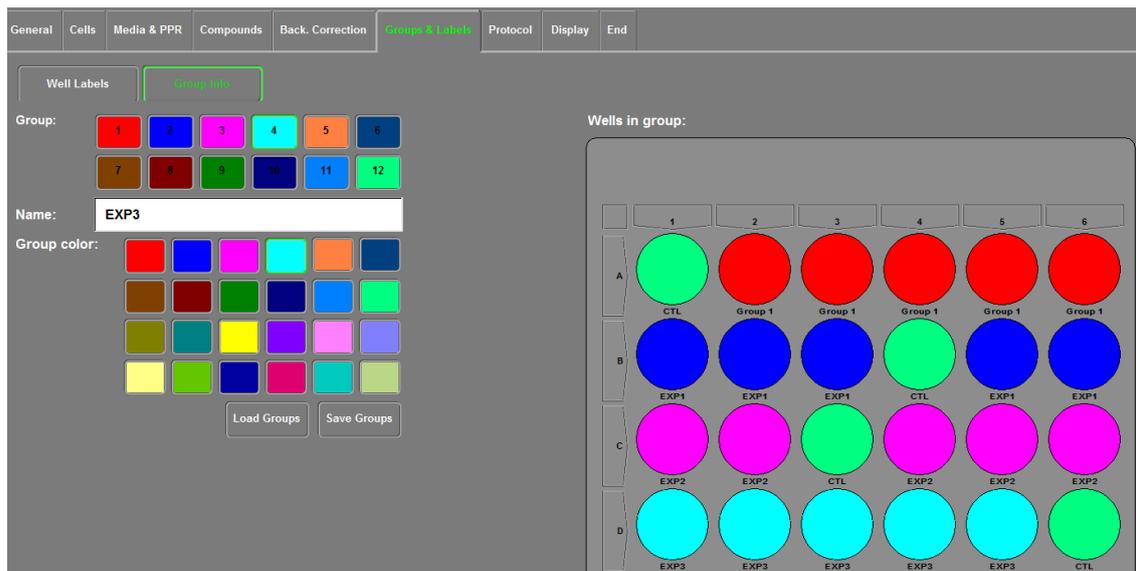
此部分的設定皆會影響到實驗的結果，務必確認次部份的設定是正確無誤的。

Back. Correction：確認左上方 Do background correction 的綠燈亮起，如此儀器才會對環境背景作校正；右方請將相對應空下沒種細胞的 Background well 點選，若空錯位置就更改軟體的設定到正確的位置。



Groups & Labels：點擊 Group info 可設定實驗組別的位置與名稱。

選取 Group 然後點擊右方的位置將同一組別標記，點擊 Name 可設定組別名子，點下方可更改組別顏色。



Protocol：此部分的設定會直接影響到儀器的運作，是整個環節最重要的部分；務必確認設定是正確的。指令的撰寫是在 Start and End 之間插入新的指令，可在右方選擇插入的指令，插入的位置會插在”反藍”的位置之上。

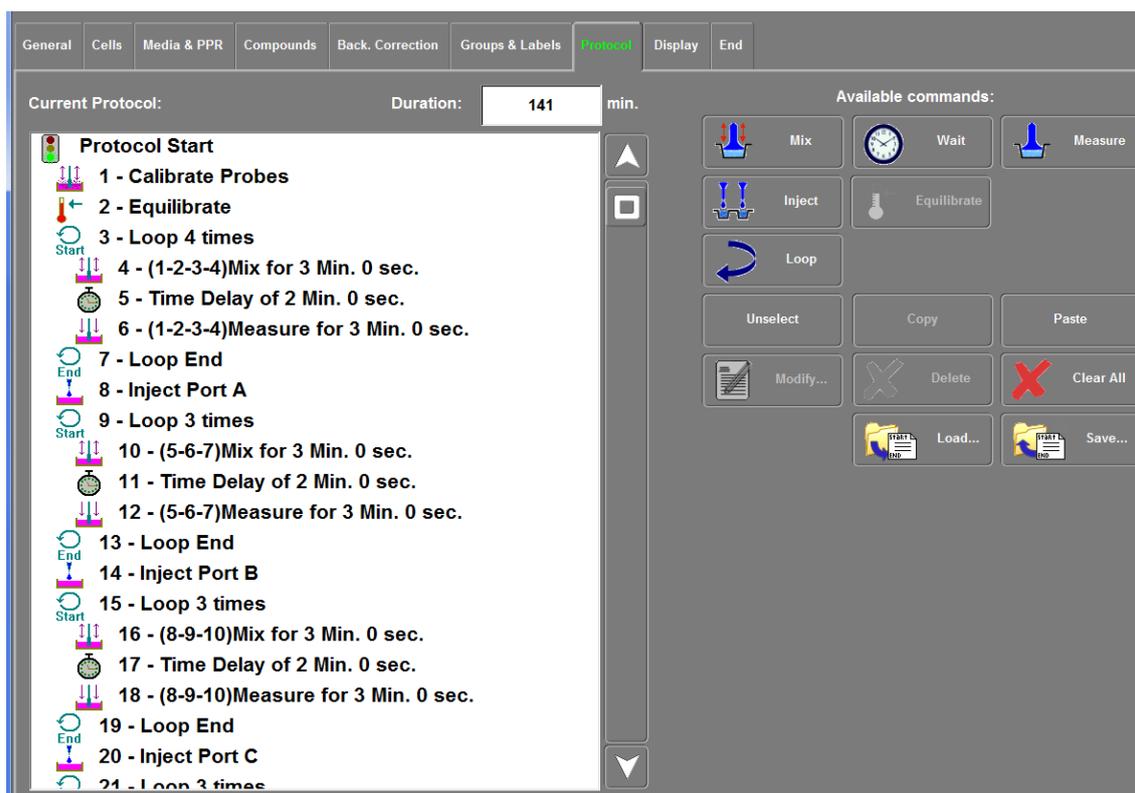
Calibrate Probe：是一開始內建必要的指令，此動作耗時 25 min，之後加入新的指令上方的 Duration 會隨之改變告知使用者此次實驗設計會需要多久時間。當校正完成後會跳出校正完成的視窗，直到使用者按下一步才會退出校正盤讓使用者放細胞進去開始實驗。

Equilibrate：建議選擇此指令做為細胞進入後的第一個動作，此動作耗時 12 min (2 min Mix, 2 min Wait 重複三次)，目的是讓細胞適應儀器內的溫度環境並讓殘留的校正液影響降到最低。

Mix-Wait-Measure(3min-2min-3min)：此三個指令為實驗的核心指令，Mix 讓整個培養基均勻混和，Wait 讓擾流穩定，Measure 時會將探針降低製造微小空間偵測樣本耗氧與產酸時的變化；可點選 Loop 將要重複的指令插在中間，並選擇重複的次數。在實驗初始未加藥前建議偵測四次，若樣本穩定應該會得到一致的訊號。

Injection：可選擇 ABCD 並輸入藥物的名稱，亦可改變藥物注入的順序；在海馬實驗注入的藥物如 Oligomycin, FCCP, Antimycin/Rotenone, glucose and 2-DG 等都可快速與細胞反應，因此建議測量三次即可；若是注入自己感興趣的藥物，可藉由改變 Loop 的次數來調整藥物反應與偵測的時間。

因此 Mito Stress Test & Glycolysis Stress Test 的 Protocol 是一樣的，在 Calibration, Equilibrate 之後會 Mix-Wait-Measure 偵測四次，之後依序加入三次藥物，每個藥物都是 Mix-Wait-Measure 偵測三次，整個實驗從校正開始到實驗結束約需 141 min。



Display：是 Data 呈現的方式，像是點與線的粗細，坐標軸的大小等；這些設定在實驗後也可以更改，在此可直接跳過。

End：到此實驗設定已完成，可直接 End Wizard 準備開始實驗；若此實驗設定以後仍會用到可以點擊 Save Template 將此設定儲存起來，儲存前須先更改上方的儲存路徑再點擊 Save Template 輸入檔案名稱，在下一次實驗前直接讀取此實驗設定進行實驗。

開始實驗

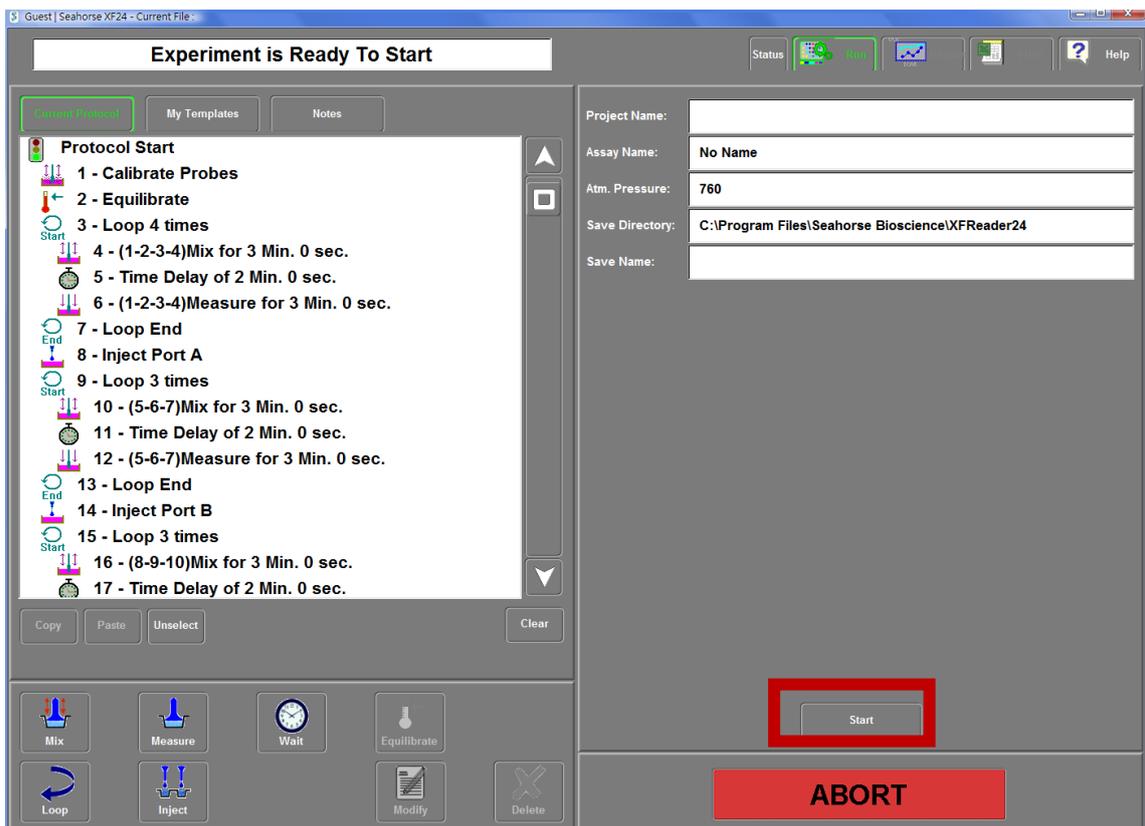
按 End 離開 Assay Wizard 的實驗設計之後，會回到初始的畫面，此時可確認左邊頁面的資訊應該已經變更為您的設定；確認無誤後就可點擊綠色的 Start。

之後會進入下方的頁面，最後兩個步驟：

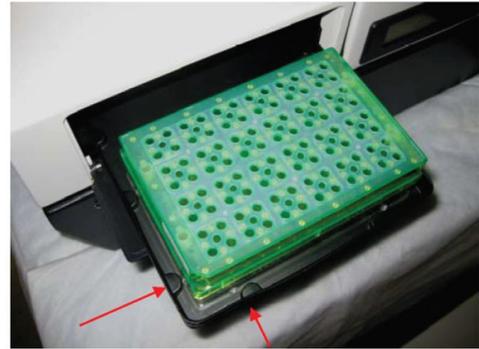
Save Directory: 選擇儲存 Data 的路徑，可以創建專屬您的資料夾來儲存。

Save Name: 設定檔案儲存名稱，若沒有設定系統會自動以上機的時間日期來命名。

按下右下方 Start 開始實驗，若要取消可按紅色的 ABORT



按下 Start 後儀器內的托盤會退出，請將已用校正液活化的探針放上去；放置時注意方向性，其條碼向後，缺口朝自己及儀器前方；並前後左右移動探針確認探針確實的卡入卡榫間(圖中紅色箭頭所指即為卡榫)。



移除探針蓋子按 Continue 讓探針進入儀器開始實驗。

約 30 min 後請回到機器端，此時已校正完成；請將校正盤退出，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。

XFe24 & XFe96

開啟 Wave Software ，軟體會自動開始與儀器連結。
連結後右方狀態列會從 Offline 變為 Connected，並自動升溫到 37 °C。
(以下說明以 Wave 2.2 版本為例)



- a. **New**：撰寫一個新的實驗設計，或是讀取已存的紀錄作修改。
- Open**：可點擊左下方 Browse 開啟實驗 Data 進行分析。
- Catalog**：可儲存常用的設定(如 Compound, Media & Cells)，方便實驗設定的撰寫。
- Options**：可更改儀器的初始設定及檔案儲存的初始路徑。
- Help**：可直接開啟原廠操作手冊，並提供原廠的連絡資訊。

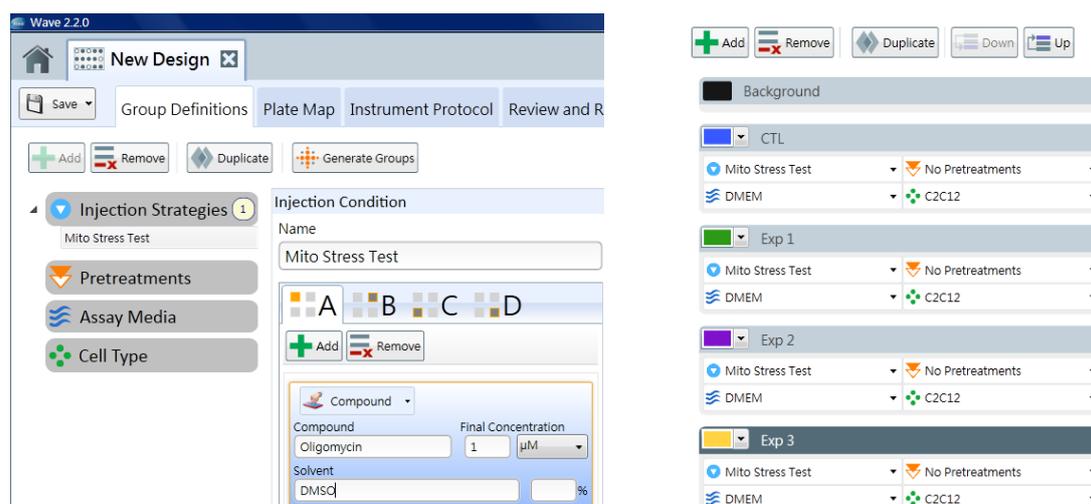
- b. Instruments**：在此可選擇您要操作的模式與平台，共分為下列幾種
1. XFe24
 2. XFe24 Hypoxia mode
 3. XFe96
 4. XFe96 Hypoxia mode
 5. XFp
- c. Template**：可點選 Blank 開始一個全新的實驗設計，或是直接開啟之前已設計好的 Template。
- d. Design**：開始實驗設計的撰寫。
- e. Import, Export & Delete**：可以輸入新的 Template，將自己在家用電腦設計好的 Template 輸出帶到機器端輸入，或是刪除多餘的 Template。

實驗前設定

點選 Blank，再點選 Design 開始實驗設計。

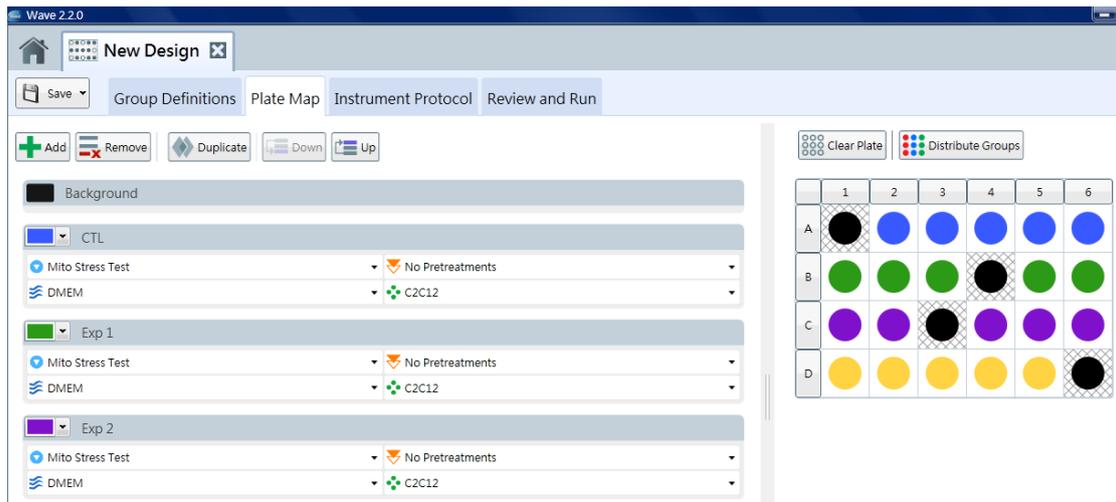


Group Definitions：此頁面用以設定組別的条件。



接著，可在右方按 Add 增加組別，組別可以更改顏色並命名，並在每個組別下方選擇剛剛填寫的 Compound, Pre-treatment, Media & Cell 等條件。

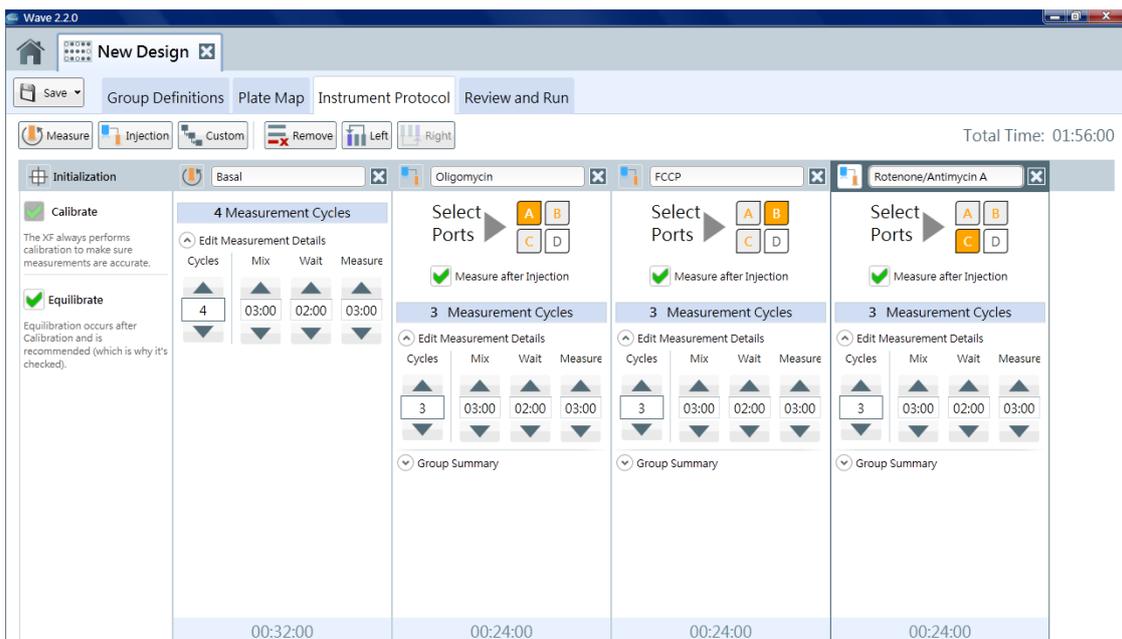
Plate Map：設定各組別在偵測盤上的位置。選擇左方的組別，並點擊右邊盤子相對應的位置；若 Background well 要做更改就點選 Background 來做調整。



Instrument Protocol：設定儀器運作的流程。

Calibrate：此是必須要做的動作，無法更改。

Equilibrate：平衡樣本與環境的指令，建議勾選。



Mix-Wait-Measure：以內建設定好，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。

每個階段下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。

Review and Run：檢視頁面並開始實驗。

在此頁面您可檢視實驗的設定資訊，若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；都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(XFe24 還需移除粉紅色的 Hydro booster)後，按 Continue 讓探針進入儀器開始實驗。

約 20 min 後請回到機器端，此時已校正完成；請將校正盤退出，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。

XFp

XFp 開機後會進入右方的畫面，並開始自動升溫至 37°C。

實驗前設定

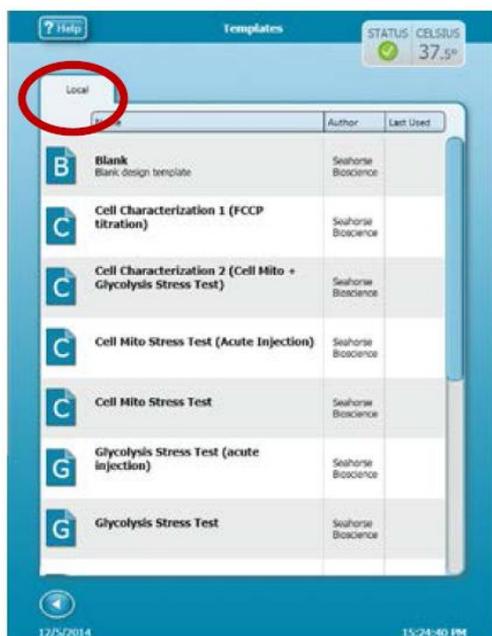
在 XFp 上無法作太詳細的實驗設定，但可使用 Wave 在個人電腦上設定好後，以 Usb 的儲存方式插入 XFp 開啟 Template。

實驗設計的細節請參照 XFe24 & XFe96 實驗設計一節。

按下 Start 開始實驗設定：



可先選擇內建的實驗設計如 Mito Stress Test, Glycolysis Stress Test or FCCP Titration 等實驗(左下圖)，下一頁可選擇組別及其相對應的位置(右下圖)。



接續下一頁是 Protocol 的設定(左下圖)，可選擇注入的藥物數量與測量次數；最後一頁可更改檔案名稱，按下 Start Assay 開始實驗。

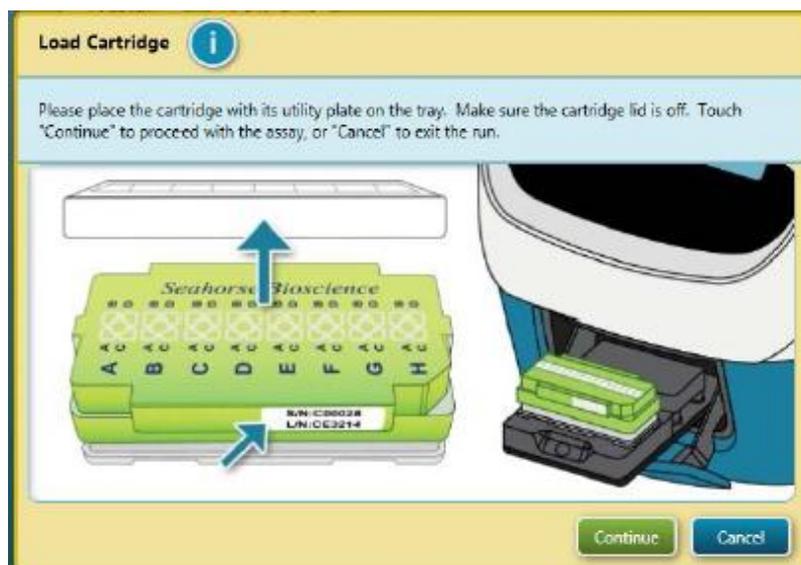


開始實驗

點擊 Start Assay 之後，會跳出 Load Cartridge 視窗供使用者參考擺放的方向性。

放置時條碼向後，缺口朝自己及儀器前方；移除蓋子按 Continue 讓探針進入儀器開始實驗。

約 20 min 後請回到機器端，此時已校正完成；請將校正盤退出，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。



Corporate Headquarters

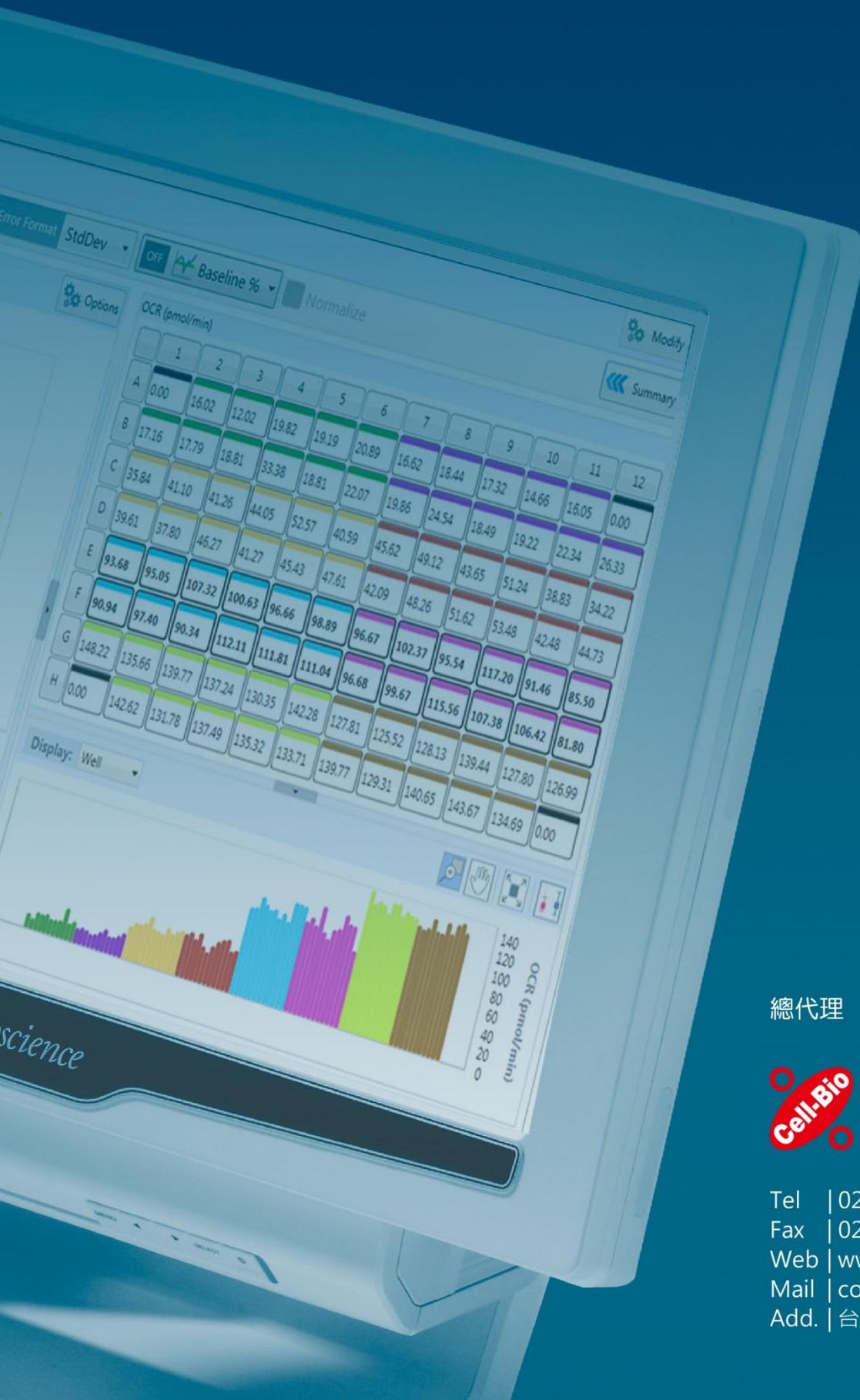
Seahorse Bioscience Inc.
16 Esquire Road North
Billerica, MA 01862 USA
+1-978-671-1600

European Headquarters

Seahorse Bioscience Europe
Symbion Science Park
Fruebjergvej 3
2100 Copenhagen Denmark
+45 31 36 98 78

Asia-Pacific Headquarters

Seahorse Bioscience
Asia 199 Guo Shou Jing
Road Suite 207 Pudong,
Shanghai 201203 CN
0086 21 33901768



總代理 *Seahorse Bioscience*

Cell-Bio 尚博生物科技
CELL-BIO-BIOTECHNOLOGY

Tel | 02-2785-5860
Fax | 02-2785-7237
Web | www.cell-bio.com.tw
Mail | contact.cellbio@gmail.com
Add. | 台北市南港區園區街三號十七樓