XFe24 海馬生物能量測定儀 操作手冊

Save - +	Add View - Sum	mary Overview				
Display: Group	Y1: Rate +	Background Correction	on Error Format StdDev	• Off Art Baseline % •		O Marthu -
400 350 300 250 (((() 200 200	X	F Cell Mito Stress Test	A A	ons OCR (pmol/min)	5 6 7 8 9	C Summary
	20 20			C 35.84 41.10 41.26 44.05 5 D 39.61 37.80 46.27 41.27 45 E 93.68 95.05 107.32 100.63 96.4	18.81 22.07 19.86 24.54 18.49 25.7 40.59 45.62 49.12 43.65 51 43 47.61 42.09 48.26 51.62 53. 6 98.89 96.67 102.33 53.	14.66 16.05 0.00 9.22 22.34 26.33 24 38.83 34.22 18 42.48 44.73
up Details	~	40 50 60 Minutes	70	G 148.22 135.66 139.77 137.24 130.39 H 0.00 142.62 131.78 137.49 135.32	1 111.04 96.68 99.67 115.56 107.3 142.28 127.81 125.	0 91.46 85.50 106.42 81.80 99
Background cmpd A-6k	cmpd A-3k	cmpd 8-3k	Details	isplay: Well •		XF ^e 24 Introduce Plankature
cmpd B-12k	cmpd A-20k	cmpd A-12k		M Second and and and Second and Second and Secon		
				Anna Anna Anna Anna Anna Anna Anna Anna		





2015 Oct

2

目錄

XF Assay Roadmap
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. Fatty Acid Oxidation
d. Complex protein Activity & Substrate Utilization
e. Mito Fuel Flex Test
3.準備上樣用的細胞10
4.準備上樣用的培養基14
- 江北然火城之后
5.活化萤九珠釘組17
Day Before Assay
Day of Assay
6.更换上機用培養基18
7.準備上機用的藥物19
8.將藥物放置在注藥槽內23
9.上機與軟體操作24

Seahorse *Bioscience*

Basic Procedure

XF Assay Roadmap



1. 確認您使用的海馬機型

XFe 24 Analyzer



並搭配正確的耗材

XFe 24 FluxPak



適用於細胞實驗

XF24 Islet FluxPak



適用於活體組織樣本

XF24 & XFe24 通用

4



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



<u>Basal Respiration</u>: 粒線體於基礎狀態時的耗氧效率 <u>ATP Production</u>: 評估粒線體有多少氧氣參與產生 ATP <u>Proton Leak</u>:反應粒線體雙層膜的完整性,類似傳統的 MMP <u>Maximal Respiration</u>: 評估粒線體的極限運作效率 <u>Spare Capacity</u>:評估粒線體所保留的潛力,也就是遇到變化可調整的彈性

<u>Non-Mito Respiration</u>: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

內容物包含

- ✓ 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)





100

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



<u>Glycolysis</u>:評估樣本從 no glucose 到瞬間 glucose 濃度飽和時的運作效率 <u>Glycolytic Capacity</u>:評估當糖解作用為樣本唯一 ATP 來源時的運作效率 <u>Glycolytic Reserve</u>:反應糖解作用代償粒線體能量缺口的狀況 <u>Non-glycolytic Acidification</u>:分析糖解作用以外的產酸背景值

對應藥物組:

XF glycolysis stress test kit

內容物包含

- ✓ Glucose
- ✓ Oligomcycin
- ✓ 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

內容物包含

- ✓ 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;因此可在不分離粒腺體 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

內容物包含
 ✓ PMP
 (可進行約 10 盤以上實驗,須測試最佳濃度)





E. Mito Fuel Flex Test:評估粒線體燃料彈性

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。 (Ex: 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)

評估的方式是藉由加入其相對應 的抑制劑來確認:



Pathway	Inhibitor	Target
Glucose	UK5099	Mitochondrial pyruvate carrier (MPC)
Glutamine	BPTES	Glutaminase (GLS1)
Fatty Acid	Etomoxir	Carnitine Palmitoyltransferase 1A (CPT1A)

對應藥物組:

XF Mito Fuel Flex Test Kit

內含

- ✓ UK5099
- ✓ BPTES
- ✓ Etomoxir

(可進行6盤實驗)





9

3. 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。

確認培養細胞數量

細胞培養盤底面積為 0.275cm²,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。

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 100uL 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 150uL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 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

- 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。
- 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℃備用,此為0.1M之NaHCO3溶液。
- 3. Sterile Water

Procedure

 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℃ 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℃ 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:

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

(建議選擇一個條件進行搜索即可)

Select from one or more of the options below:

Research Area	Please select one
Cell Type	Please select one
Cell Line	Please select one
XF Assay	Please select one
Author	Last Name, First Initial, eg:Yang Y
	Submit Reset



12

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。 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。

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<u>不要加入 sodium bicarbonate</u>, 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。

<u>血清加入 2%</u>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。 <u>平常用的培養基是現成 Liquid</u>

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, <u>2mM GlutaMAX</u>, 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 CaCl₂)	1.8 mM	1.8 mM
NaCl	143 mM	143 mM
ксі	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

請依細胞特性與實驗設計將 Glucose, pyruvate and glutamine 配製到所 需濃度!



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℃無 CO₂的環境內 overnight 活化。

37℃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。

於 utility plate 上 24 個 well 皆加入 <u>ImL</u> 校正液,<u>中間放置粉紅色的 Hydro</u> <u>Booster 後再放上螢光探針</u>;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。

Cartridge Lid	S/N:B00180 L/N:B31412
Sensor Cartridge	North Carlos
Hydro Booster	
Utility Plate	

† 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℃;更換完後將細胞放置於 37℃ 無 CO₂的環 境等待上機。

更換流程

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 <u>675 uL</u>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.

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/Antimyin 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 μL	100 µM
FCCP	720 μL	100 µM
Rotenone/ antimycin A	540 μL	50 µM

Oligomycin

為單純的抑制劑,建議 Final conc.為1uM;因此準備10uM 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 uM,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 uM;因此準備 5 uM 放入注藥槽。

2. 需要多少用多少

使用DMSO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/Antimyin A 分別取 126, 144, 54 uL DMSO 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 Fincal 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 μL	100 mM
Oligomycin	720 μL	100 µM
2-DG	3000 μL	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 uM;因此準備 10 uM 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!



Google Play

https://play.google.com/store/apps/details?id=air.com.seahorsebio.calcul ator&hl=en

iTunes

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

或直接搜尋 Seahorse Bioscience APP 就可以找到了。



23

8. 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 不可過酸或過驗;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。



XFe 24

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。

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。



A

9. 上機與軟體操作

上機前務必將儀器升溫至 37℃,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。

<u>XFe24</u>

し。 (以下說 Wave 2.20	明以 Wave 2.2 版本	為例)	Heater ON
Wave Home	NEW ASSAY	b	
New Open Catalog Options	XFe24 xFe24 Extracellular Flux Analyzer	XFe24 Hypoxia Mode XFe24 Analyzer installed in a Hypoxia Chambe XFe96 Extracellular Flux Analyzer XFe96	••
Help	Blank	C I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	Design
		more 11, Autt Sec Dess Bla	nea 6/2014 ivor ihorse Bloscience ription nk design template for an XFp
		Proj	ect Name

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 Seahorse *Bioscience*

- 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條件。

📻 Wave 2.2.0			
new Design 🗵		Add Remove	Duplicate Down Up
Group Definitions P	late Map Instrument Protocol Review and R	Background	
		CTL CTL	
Add Remove Duplicate	Generate Groups	😒 Mito Stress Test	🔹 😽 No Pretreatments 🔹 👻
Injection Strategies 1	Injection Condition	S DMEM	• • C2C12 •
Mito Stress Test	Name	Fxp 1	
	Mito Stress Test	Alita Ctrass Test	- No Destroctments
Pretreatments			Cocla
≶ Assay Media	A B C D	S DIVIEIVI	
Call Trues	Add Remove	Exp 2	
Cell Type		😒 Mito Stress Test	🔹 😽 No Pretreatments 🔹
	<i> Compound</i> 🗸	S DMEM	• • C2C12 •
	Compound Final Concentration	Euro 2	
	Oligomycin 1 µM •	Exp 3	-
	Solvent MSO	V Mito Stress Test	No Pretreatments
		S DMEM	• • C2C12 •

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。

🐖 Wave 2.2.0			
🕋 🔛 New Design 🛛			
Group Definitions Plate Map	Instrument Protocol Review	and Run	
Add Remove Duplicate G Dowr	[] □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □		Clear Plate
Background			1 2 3 4 5 6
CTL			
 Mito Stress Test 	🔹 😽 No Pretreatments	•	
S DMEM	 C2C12 	•	
• Exp 1			
Mito Stress Test	🔹 😽 No Pretreatments	•	
S DMEM	• • C2C12	•	
Exp 2			
Mito Stress Test	🔹 😽 No Pretreatments	•	
S DMEM	▼ C2C12	•	

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。

💭 Wave 2.2.0																
1 New Desig	gn 🛛															
Group De	finitions	Plate N	/lap In	strument	Protocol	Review	w and F	lun								
UMeasure Injection	Cust	tom	Remove	Left	Right	t									Tot	al Time: 0
Initialization	U Ba	asal				gomycin		X	FC	CP		×	Ro	tenone/An	timycin A	×
Calibrate	4	Measurer	ment Cyc	les	Se Po	elect		B	Se Po	elect		B	Se Po	elect		B
calibration to make sure measurements are accurate.	Cycles	Mix	Wait	Measure		Measure a	after Injec	tion		Measure	after Injec	tion		Measure	after Injec	tion
Equilibrate	4	03:00	02:00	03:00	3	Measurer	ment Cy	cles	3	Measure	ment Cy	cles	3	Measure	ment Cy	cles
Calibration and is recommended (which is why it's checked).			•	•	 Edit M Cycles 	easuremen Mix	t Details Wait	Measure	 Edit M Cycles 	leasuremer Mix	t Details Wait	Measure	 Edit M Cycles 	leasuremer Mix	nt Details Wait	Measure
					3	A 03:00	A 02:00	A 03:00	3	A 03:00	A 02:00	A 03:00	3	A 03:00	A 02:00	03:00
							▼			▼	▼			▼		
					(👻 Group	Summary			() Group	Summary			Group (Summary		
		00:3	2:00			00:24	4:00			00:2	4:00			00:2	4:00	



27

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。



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

StdDev

A Baseline % +

14.05

100.63

112.11 /111.81

45.43

6.66

137.24 130.35 142.28 127.81

133.71

40.59

47.61

98.89

111.04

139.77

45.62

42.09

96.67

96.68

24 51

43.65

51.62

95.54

115.56

128.13

140.65 143,67 53.48

117.20

107.38

139.44

42.48

91.46

106.42

127.80

134.69 0.00

44.73

85.50

81.80

126.99

49.12

48.26

102.37

99.67

125.52

129.31

OCR (pmol/min

41.10

107.32

131.78 137.49 135.32

90.34

139.77

75.05

97.40

135.66

42.62

35.84

39.61

93.68

90.94

148.22

Display: Well

science

European Headquarters

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

A Modif

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



尚博生物科技 CELL-BIO-BIOTECHNOLOGY

Tel 02-2785-5860 02-2785-7237 Fax 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