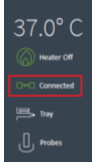


A.实验前一天-准备工作

一、 刷卡预热系统

1. 提前联系管理员获取权限后刷卡上机。
2. 打开Wave软件，等待控制器与仪器主机连接成功（如下图），并升温至37℃。



NOTE: Seahorse XFe96检测系统至少提前5小时开启。（该仪器**按次**收费!!!）

二、 水化探针板（两步法-第一步）

1. 将至少20mL的XF校准液（XF Calibrant）加入50mL离心管中，放入37℃无CO₂细胞培养箱中孵育过夜（无CO₂指未额外补充CO₂）。
2. 打开Seahorse XFe96 Flux Assay Kit取出探针板装，包含底部的水化板、绿色的探针板和盖子。
3. 从水化板上取下盖子和探针板，并倒置于实验台上（保护探针板上的sensor不被损坏）。
4. 向水化板的每个孔中加入200μL无菌水。
5. 取盖子和探针板对准水化板各孔，重新放到水化板上还原整个装置，使Sensor浸没于无菌水中。

NOTE:

- a) 该过程请注意保护sensor，可参考下图操作，先倾斜探针板将第1列（或行）sensor对准放置于孔中，然后顺势降低探针板使所有sensor放入孔中。
- b) 该过程可能会引起sensor表面与液体间产生气泡，故在还原装置后可再次上下轻微移动探针板以达到排汽泡的目的



6. 再次检查无菌水液面是否高于所有sensor，确保所有sensor浸没于无菌水中。
7. 将整个探针板装置放入37℃无CO₂细胞培养箱（无CO₂指未额外补充CO₂）中温育过夜。

三、种贴壁细胞或包被细胞板

1. 实验细胞类型是**贴壁细胞**，需要提前一晚种细胞到细胞板内，一般情况下每孔种植细胞5 000~40 000个，一组实验需要至少3个平行孔，推荐设置4个平行孔。

NOTE: 50-90%汇合度代谢速率会在仪器的理想/动态范围内，背景校正孔（A1、A12、H1、H12）中无细胞。

2. 实验细胞类型是**悬浮细胞**，则需要提前将细胞板用无菌多聚赖氨酸PLL（0.1mg/mL）包被，PLL包被需要静置30-60min以上。包被好后需放入37℃培养箱（也可放4℃冰箱，保持无菌即可），静置4-24h以上，确保培养瓶底部干燥、无液体。

NOTE:

- a) PLL需要4℃下保存，且有轻微毒性，包被后的培养器皿使用前必须用PBS或培养基清洗1次。
- b) 一般推荐原代细胞和免疫细胞每孔大约10 000-20 000左右，推荐设置4个平行孔，背景校正孔中无细胞。

B. 实验当天-上机检测

一、水化探针板（两步法-第二步）

1. 从37℃无CO₂细胞培养箱中取出温育XF校准液的离心管和探针板装置。
2. 从水化板上取下盖子和探针板，并倒置于实验台上。
3. 将水化板中的无菌水弃掉。
4. 向水化板的每个孔中加入200 μL XF校准液。
5. 将盖子和探针板对准水化板各孔，重新放到水化板上还原整个装置，使Sensor浸没于XF校准液中。
6. 将整个探针板装置放入37℃无CO₂细胞培养箱中水化45-60 min（可延长），等待配药。

NOTE: 两步水化法能够尽量避免在过夜孵育期间形成气泡，气泡干扰仪器校准并可能导致负耗氧率（OCR）。

二、配药：

根据试剂盒说明书，配制并稀释药物至所需浓度。

Cell Mito Stress Test（线粒体压力测试）

	检测液体积/ μL	母液浓度/ μM	终浓度/ μM	Volume/ μL
PortA:Oligomycin	630	100	1.5	20
PortB:FCCP	720	100	0.5 (不固定)	22
PortC:Rotenone+ Antimycin A	540	50	0.5	25

a) 对于大部分细胞系而言，oligomycin浓度建议1.5 μM ，Rot/AA浓度建议0.5 μM ，对于所有细胞系的FCCP浓度建议进行优化。

b) 值得注意的是，FCCP的最佳终浓度是细胞系相关的。建议每种新细胞系需要进行最适FCCP浓度的摸索，如果浓度偏低会造成OCR无法达到最大响应值，而超过最适浓度会引起OCR响应值低于最大值。

Glycolysis Stress Test（糖酵解压力测试）

	检测液体积/ μL	母液浓度/ μM	终浓度/ μM	Volume/ μL
PortA:Glucose	3000	100 mM	直接加	20
PortB:Oligomycin	720	100 μM	2.0	22
PortC:2-DG	3000	500 mM	直接加	25

三、清洗细胞

3.1 若接种了贴壁细胞，则参照下列流程为贴壁细胞换液

- 取出37 $^{\circ}\text{C}$ 温育的检测液，准备为细胞换液。
- 从CO₂细胞培养箱中取出培养好的贴壁细胞，并在显微镜下观察细胞状态。
 - 检查细胞形态、均匀度并保证无污染情况。保证细胞贴壁良好，汇合度达到基本标准，无细胞堆积。
 - 细胞汇合度80-90%左右为最佳，更重要的是孔中细胞分布要均匀。
- 将细胞培养板所有孔中的生长培养基吸弃60 μL 但需剩余20 μL 。
 - 建议勿使用真空吸液装置，因为较难控制吸液体积并容易损伤细胞。
 - 吸液时勿损伤细胞，并保证足够的剩余培养基覆盖细胞。
- 清洗细胞：向所有孔中加入200 μL 检测液，然后再吸弃200 μL 。
- 重复上一步操作，孔中剩余20 μL 检测液。
- 向所有孔中加入160 μL 检测液，使终体积为180 μL 。
- 在显微镜下观察，以确保换液过程中没有洗掉或划掉细胞造成分布不均。
- 将细胞培养板放入37 $^{\circ}\text{C}$ 无CO₂细胞培养箱中60min等待上机检测。

3.2 若使用悬浮细胞，则按照下列流程接种细胞：

- 取出37 $^{\circ}\text{C}$ 温育的检测液，准备为细胞换液。
- 在室温下以200 $\times$ g离心细胞5min。
- 离心细胞时，向已放至室温条件，包被的细胞培养板的背景校正孔中加入50 μL 检测液。
- 将离心后的细胞上清液弃去。
- 向离心管中加入合适体积的温育检测液重悬细胞，以得到所需的每孔中50 μL 的细胞密度（如每孔接种10K cells/50 μL ，则离心管中100孔接种量应为1000K cells/5mL）。
- 将离心机设置更改为零制动（一般推荐升0降0）。
- 向细胞培养板中沿每孔侧壁加入50 μL 细胞悬液，背景校正孔请勿接种细胞。
- 以200 $\times$ g（零制动）离心细胞板1min。确保离心机经适当平衡。
- 将细胞培养板放入未补充CO₂的细胞培养箱，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养25-30min确保细胞完全贴壁。
- 将130 μL 预热的检测液沿每孔侧壁缓慢补加入各细胞孔，注意不要扰乱细胞。显微镜下观察细胞，确保细胞贴壁。
- 将细胞板放回培养箱中培养15~25 min后，细胞即可用于分析。

NOTE：为获得最佳结果，离心后的总时间不超过60 min。

四、加药：

将稀释好的药物分别加入测试板上的A，B，C，D 四个加药孔中。

A	B
C	D

注1：加药力度要把握好。因加药孔底部为孔洞，药物依靠表面张力保留在药仓内，故加药时力量不能太大以避免漏药，也不要停顿以避免产生气泡，而是沿着药仓壁一气呵成一次性轻轻加入。

注2：根据实验设计选择所用加药孔数量（1~4个都行，但是一旦选定用A号孔所有都必须加在A孔，哪怕是Blank细胞孔也不能漏掉。但是其他号药仓可以为空）。