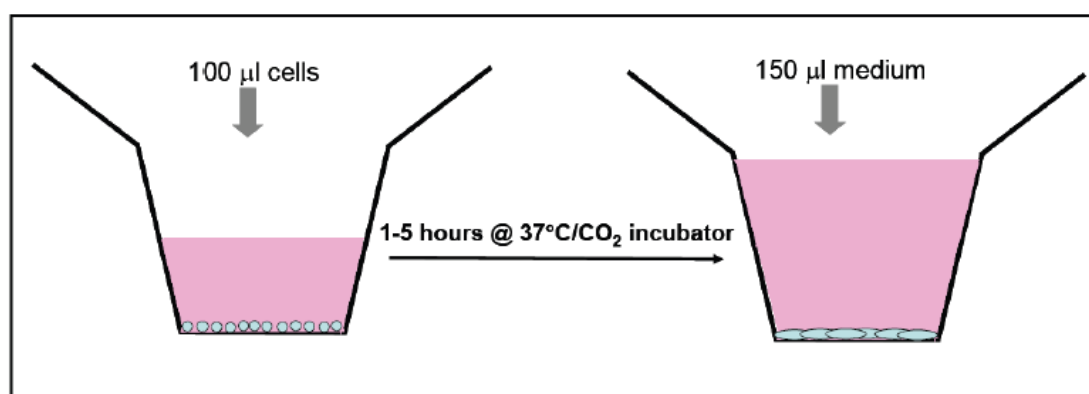


## 實驗前一天

### 準備實驗所需要的細胞

XFe 24 cell culture microplate 底面積與市面上的 96 well plate 相近，初次進行海馬實驗之前，建議使用一般的 96 well plate 進行 cell density titration test，大部分細胞的範圍介於 10,000~100,000 顆/ well。最佳的細胞數量是於上機當天於顯微鏡下觀察為單層全滿，僅留些許空隙來確認是否為單層細胞；若細胞過滿會造成細胞壓力，細胞不足則會造成訊號偏低甚至沒有訊號。

於 XFe24 cell culture microplate 請以兩段式注入準備細胞，先將測試過的最佳細胞數懸浮在 100 $\mu$  L 培養基內(平常使用的培養基)，緩緩注入底部，於數小時細胞貼附後再加入 150 $\mu$  L，隔日於顯微鏡下觀察選擇最佳的數量；A1, B4, C3, D6 請不要種細胞僅加入培養基作為海馬校正環境溫度的標準。



### 準備上機用的培養基

海馬實驗為了有效偵測糖解作用，必須將培養基內的 Buffer Reagent (Sodium bicarbonate, HEPES etc.) 移除，並降低血清比例到 2%，因為血清內大量的白蛋白同樣有緩衝的效果；建議使用 powder medium 來準備培養基，配好後不要加入 sodium bicarbonate 即可。其餘會外加的成分(ex: glutamine, sodium pyruvate etc.) 都建議補進去，以維持細胞培養環境的一致性。

### 準備上機用的探針組

XFe24 Extracellular flux assay kit 的構造為上下兩層，請於下方 24 孔盤每個孔洞加入 1mL 校正液，中間夾入 Hydro Booster，將上方綠色探針浸入並確認 24 個探針都有浸到校正液。將探針組置於 37°C 不含 CO<sub>2</sub> 的環境 ON，以確保螢光探針達最佳活化狀態；

原廠建議螢光探針最佳使用時間為起始活化後 72 小時內。



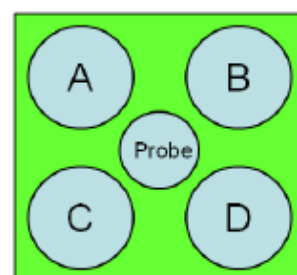
# 實驗當天

## 更換上機用的培養基

請準備 50 mL 以上的上機用培養基，並確實回溫到 37°C；更換培養基前先於顯微鏡下確認細胞數目與均勻度適合上機，將殘留的 media 以 pipetmen 全部移除 (勿使用 suction)，不須 wash，沿斜坡緩緩加入 675 $\mu$  L 上機用培養基；以上流程一次處理一排樣本即可，勿一次處理整盤樣本，使樣本處於沒有培養基的環境太久；全部更換完後至顯微鏡下確認細胞狀態與更換前相同，將樣本放到 37°C 不含 CO<sub>2</sub> 的環境等待上機。

## 準備上機用的藥物

根據實驗的設計不同，可以準備不同的試劑以自動注入的方式加入細胞內；藥物會先加入探針組上方 A, B, C & D 四個注藥槽，使用者可由軟體控制注入順序。



藥物注入建議體積依注入順序逐漸增加，A port 為 75 $\mu$  L、B port 為 85 $\mu$  L、C port 為 95 $\mu$  L、D port 為 100 $\mu$  L，如此當底部為 675 $\mu$  L 時依 ABCD 順序注入時皆會是 10X 稀釋；藥物需使用上機培養基稀釋配製，以確保 pH 環境的一致性。

當以上動作都完成後，就可以將探針組放進海馬內校正，準備進行實驗囉！