

# Agilent Technologies 社製

## 細胞外フラックスアナライザー

### PER データ計算 クイックリファレンスガイド



#### 【はじめに】

Agilent Seahorse XF pH センサープローブは、マイクロチャンバー内のフリーのプロトンの濃度変化をリアルタイムで測定します。このデータを ECAR (Extracellular Acidification Rate : 細胞外酸性化速度) と呼びます。

Agilent 社はこの度新たな指標である“**PER** (Proton Efflux Rate : プロトン流出速度)”を導入しました。

- PER では、培地の緩衝能とマイクロチャンバーの微小空間の容量が考慮されます。
- PPR (Proton Production Rate : プロトン生成速度) は PER の元となる指標です。

表 1 は細胞外酸性化の測定法の比較です。

表 1 : 細胞外酸性化の測定法の比較

酸性化データの種類	ECAR	PPR	PER
測定単位	mpH/min	pmol H+/min	pmol H+/min
あらゆる供給源からの細胞外酸性化を検出する	はい	はい	はい
培地の配合によって変化する	はい	いいえ	いいえ
Buffer Factor を考慮する	いいえ	いいえ	はい
センサーシステム及び培地のパラメータ	使用しない	Buffer Capacity	<b>Buffer Factor</b>
マイクロチャンバーの微小空間の容量を考慮する	いいえ	いいえ	はい
計測中に表示される	はい	いいえ	いいえ

#### 【Proton Efflux Rate (PER)】

- PER は Wave ソフトウェア (バージョン 2.4 以降) で算出可能な新しい速度データです。
- PER は細胞外酸性化のより正確な指標であり、計測後のリザルト解析でのみ利用可能です。計測実行中は表示されません。
- ECAR は Wave ソフトウェアでレポートされるデフォルトの酸性化データです。[Rate]ドロップダウンメニューに表示される 3 つの速度は、OCR/ECAR/PER です (設定により PER⇒PPR に変更可能)。
- PER の計算式 :
  - **PER (pmol H+/min) = ECAR (mpH/min) × BF (mmol/L/pH) × チャンバー容量 (μL) × Kvol**

表 2 : PER 関連変数

種類	単位	説明
ECAR (Extracellular Acidification Rate)	mpH/min	計測中に測定される。ウェル内の mpH の変化速度。
Buffer Factor (BF)	mmol/L/pH	XF 装置で得られた細胞中の Buffer Capacity の尺度で、培地及びセンサーシステムの Buffer Capacity を考慮する。標準的な XF Glycolytic Rate Assay 培地では、この値は予め設定されている。
Geometric volume	μL	マイクロチャンバーが完全に密閉されていると仮定して測定された物理的容積。
Volume scaling factor (Kvol)	なし	測定チャンバー内での総プロトン生成量を算出するために使用される、経験的に得られた係数。

## 【Wave で PER データを表示する】

Wave ソフトウェアは、XFe96、XFe24、XFp、XF96 で計測した Total PER（あらゆる供給源からの酸化データ）を算出します。「Overview」「OCR vs. ECAR」ビューの、[Rate]のドロップダウンメニューを使用して、PER を選択します。

### Wave で PER データを表示するための条件

PER を正確に計算・表示するには、センサーシステム（及び全てのウェル）の Buffer Factor の情報が必要です。次の条件に全て該当する場合、Wave は自動的に PER を表示します。

1. 計測時に、Buffer Factor がセンサーカートリッジのバーコードから自動的に読み取られている。
  - 古い計測データを解析する場合、Buffer Factor 情報が読み取られていない場合があります。
2. アッセイプレートは、全 Group において XF Glycolytic Rate Assay 培地（DMEM / RPMI)を使用している。
3. サポートされているプレートとカートリッジを使用している。
 

※以下のセンサーカートリッジ/プレートはサポートされていません。

  - XF24、XF24-3 センサーカートリッジ
  - スフェロイド、蔦島、V28 プレート

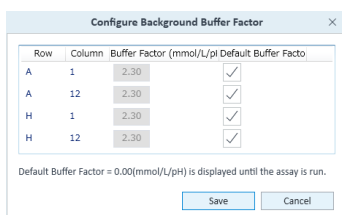
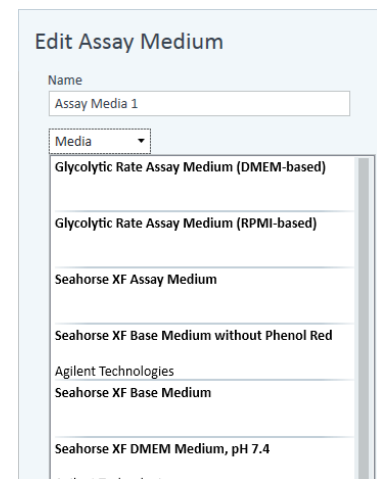
### PER が表示されない場合

XF Glycolytic Rate Assay 培地（DMEM / RPMI）以外の培地を使用している場合は、Buffer Factor をマニュアルで設定する必要があります。次ページ「カスタムアッセイ培地を使用した場合の PER 表示方法」をご参照ください。

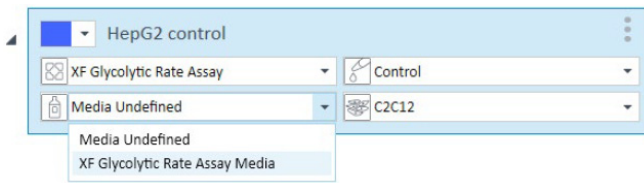
- 詳細な説明及び Buffer Factor を計算するアッセイプレートについては「Agilent Seahorse XF Buffer Factor Protocol」をご参照ください。※下記より「XF Glycolytic Rate Assay Report Generator」をダウンロードすると、同時にダウンロードされます。
- ダウンロード：<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/xf-glycolytic-rate-assay-report-generator>

XF Glycolytic Rate Assay 培地を使って実験しても、テンプレートで培地の設定をしていない場合は、以下の手順で設定します。

1. Wave ソフトウェアでアッセイリザルトファイルを開きます。
  2. [Modify]をクリックします。
  3. 「Assay Media」の横にある[Add]をクリックします。
- 
4. Media catalog ドロップダウンメニューを使用し、アッセイ培地を選択します。
    - Seahorse XF DMEM Medium, pH 7.4
    - Seahorse XF RPMI Medium, pH 7.4
    - Glycolytic Rate Assay Medium (DMEM-based)
    - Glycolytic Rate Assay Medium (RPMI-based)
  5. 次に、「Assay Media」をクリックして、「Background Well Buffer Factor」を設定します。
  6. [Configure]をクリックします。
  7. 「Default Buffer Factor」の下の、各バックグラウンドウェルの隣にあるチェックボックスにチェックを入れて[Save]をクリックします。



8. アッセイ培地を各グループに割り当てます。[**Collapse/Expand All**]をクリックして、Group Definitions を表示します。
9. [**Media**]のドロップダウンメニューで、各グループの培地を設定します。
  - Seahorse XF DMEM / RPMI Medium, pH 7.4、Glycolytic Rate Assay Medium (DMEM-based) / (RPMI-based)

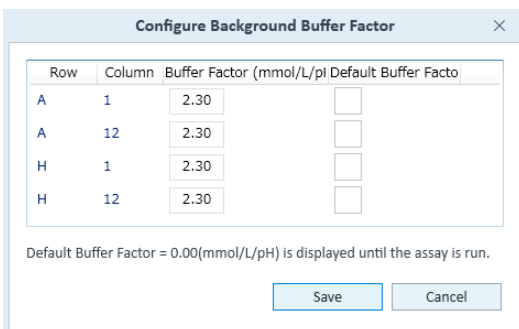


10. 追加が完了したら[**Apply**]をクリックします。
11. カイネティックグラフやプレートマップに PER データを表示させる場合は、[**Rate**]ドロップダウンメニューを使用して選択します。
12. 解析が完了したら、リザルトファイルを保存します。

### カスタムアッセイ培地を使用した場合の PER 表示方法

アッセイを行う前に、カスタムアッセイ培地の Buffer Factor を算出する必要があります。この手順については、「Agilent Seahorse XF Buffer Factor Protocol」をご参照ください（入手先：前ページ参照）。

1. **Wave** ソフトウェアでアッセイリザルトファイルを開きます。
2. [**Modify**]をクリックします。
3. 「**Assay Media**」の横にある[**Add**]をクリックします。
4. 「Edit Assay Medium」ウィンドウで、表示されたフィールドに予め算出した Buffer Factor 値を入力します。
5. 次に、「**Assay Media**」をクリックして、「Background Well Buffer Factor」を設定します。
6. [**Configure**]をクリックします。
7. **Buffer Factor (mmol/L/pH)** に、先程と同じ Buffer Factor 値を入力し、[**Save**]をクリックします。



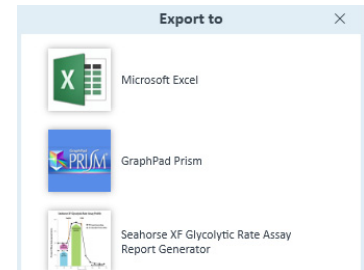
8. アッセイ培地を各グループに割り当てます。[**Collapse/Expand All**]をクリックして、Group Definitions を表示します。
9. [**Media**]のドロップダウンメニューで、各グループの培地を設定します。
10. 終了したら、[**Apply**]をクリックします。
11. カイネティックグラフやプレートマップに PER データを表示させる場合は、[**Rate**] ドロップダウンメニューを使用して選択します。
12. 解析が完了したら、リザルトファイルを保存します。

## 【エクスポートオプション：追加のデータ解析】

### 「Glycolytic Proton Efflux Rate (glycoPER)：解糖特異的な酸性化速度」の計算

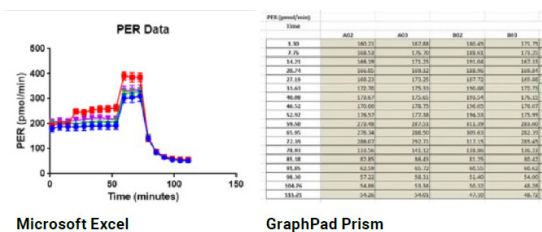
- Wave ソフトウェアは Total PER（あらゆる供給源からの酸性化データ）を計算し、細胞外酸性化の要因は区別しません。
- XF Glycolytic Rate アッセイを実行した場合は、**glycoPER** を計算するため、XF Glycolytic Rate Assay Report Generator にデータをエクスポートして解析する必要があります。
  - **glycoPER**：解析培地の全体の酸性化速度から、ミトコンドリア呼吸の過程で産生される二酸化炭素による解析培地の酸性化速度を差し引いた、解糖特異的な酸性化速度

1. **Wave** ソフトウェアでアッセイリザルトファイルを開きます。
2. **[Export]** をクリックします。
3. リストが「**XF Glycolytic Rate Assay Report Generator**」を選択します。
4. 必要に応じてファイル名や保存場所を変更し、**[Save]** をクリックします。



### Total PER データのエクスポート

PER データは、Microsoft Excel、GraphPad Prism のエクスポートファイルに含まれています。マニュアルで PER データ解析やグラフ作成を行う場合は、**Export** 機能から Microsoft Excel / GraphPad Prism を選択してエクスポートしてください。



関連リンク：

Wave ソフトウェアの機能・最新バージョンのダウンロード：<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/software-download-for-wave-desktop>

解糖機能解析について：[www.agilent.com/chem/glycolysisXF](http://www.agilent.com/chem/glycolysisXF)

Seahorse XF テクノロジーに関する最新情報：[www.agilent.com/chem/discoverXF](http://www.agilent.com/chem/discoverXF)

ご不明な点がある場合は、弊社テクニカルサポートまでご連絡お願い致します。



お問合せ：  
**プライムテック株式会社**  
[www.primetech.co.jp](http://www.primetech.co.jp)

技術部・テクニカルサポート

東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F  
 Phone：03-3816-0851(代表) Fax：03-3814-5080  
 E-mail：support@primetech.co.jp