



## Seahorse XF 实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

#### 2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
Lipofectamine 3000	赛默飞	L3000015
Opti-MEM	赛默飞	31985070

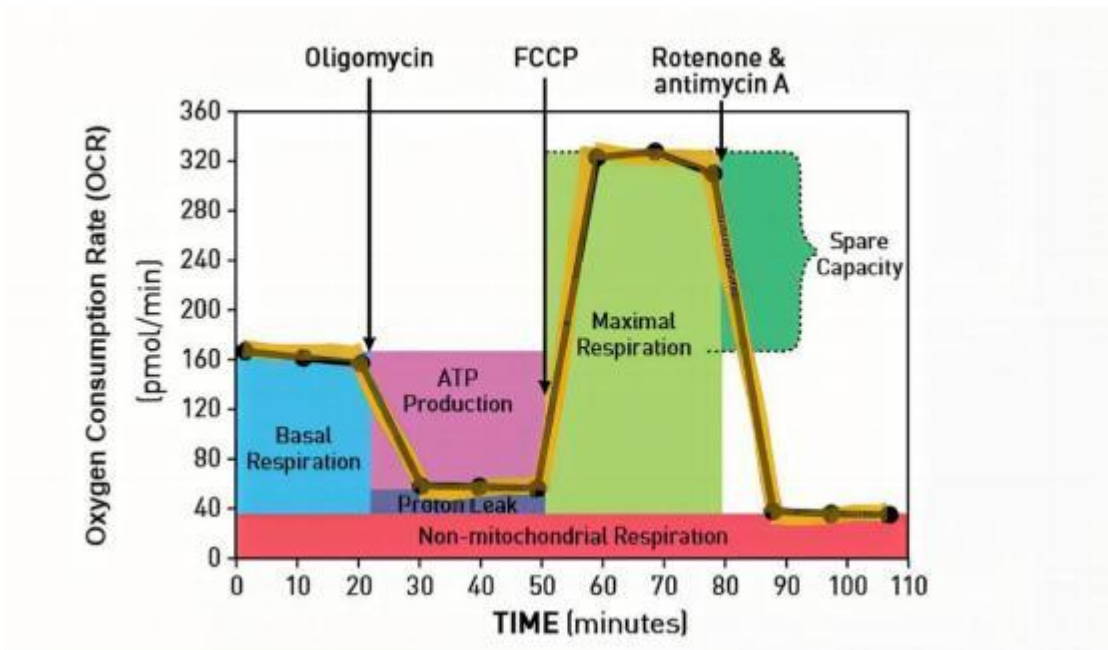
## 二、Seahorse XF24 实验（OCR&ECAR）检测步骤

### 一、实验原理

Seahorse 能量代谢分析仪是一种用于测量细胞能量代谢的仪器，可以通过测量细胞的耗氧率（OCR）和胞外酸化率（ECAR）来评估细胞的线粒体功能、糖酵解和氧化磷酸化等过程。OCR 和 ECAR 的测量原理如下：

#### （1）OCR（Oxygen Consumption Rate）

OCR 是指细胞对氧气的消耗速率。Seahorse 能量代谢分析仪通过测量细胞周围培养基中的溶解氧含量的变化来确定 OCR。在测量过程中，细胞被置于特定的耗氧试剂中，如噻唑类化合物（例如，琥珀酸、马拉酸和氰化钠）。这些试剂会与细胞内的线粒体呼吸链相互作用，导致氧气消耗速率的变化。Seahorse 能量代谢分析仪通过测量耗氧试剂与细胞周围培养基中溶解氧含量的变化，计算细胞的 OCR



（A）基础呼吸（Basal respiration）：用于满足细胞的 ATP 需求和质子漏的耗氧。代表细胞在基础状态下的能量需求。（B）第一次加药——寡霉素（Oligomycin）：是一种抑制线粒体 ATP 合酶，即抑制呼吸链上的线粒体复合物 V。该药可以影响或降低通过 ETC 的电子流。加入 oligo 之后 OCR 从基础呼吸降低的部分即为氧化磷酸化的耗氧率（ATP production）。

（C）第一次加药后下降——ATP 合成（ATP production, ATP-linked respiration）：加入 oligomycin 后产生的耗氧下降部分，占基础呼吸耗氧的一部分，用于驱动 ATP 合成。代表线粒体满足细胞能量需求的 ATP 合成能力。

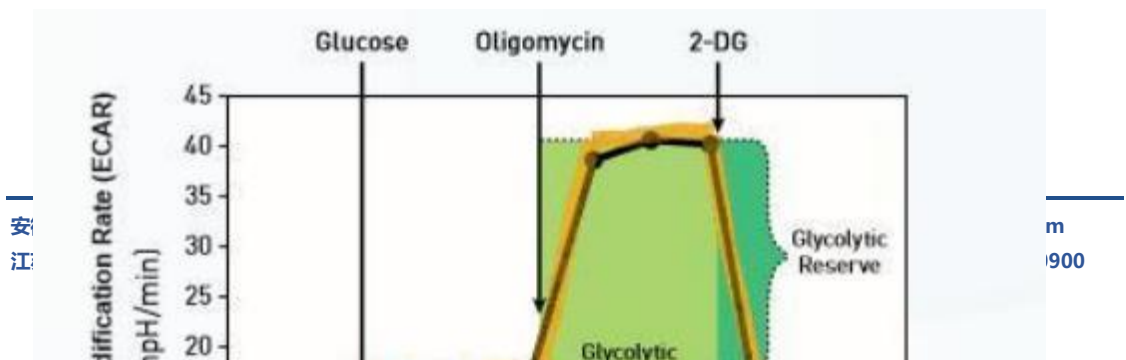
(D) 第二次加药——FCCP：是一种线粒体解偶联剂，加入该药会破坏质子梯度和线粒体膜电位，引起电子在 ETC 不受限制地传递，同时复合物IV的耗氧达到最大。FCCP 刺激的 OCR 可被用来计算细胞备用呼吸能力（该值为最大呼吸与基础呼吸的差值），备用呼吸能力代表细胞对能量需求增加或在压力下作出反应的能力。

(E) 第二次加药后上升——最大耗氧量（maximal respiration）：加入 FCCP 后获得的细胞最大耗氧。FCCP 通过刺激细胞呼吸链以最大能力工作，来模拟一种生理上的“能量需求”，这引起了底物（糖、脂肪、氨基酸）的快速氧化以应对这种代谢挑战。代表了细胞能够实现的最大呼吸速率的抑制剂。这两种药物可关闭线粒体呼吸，从而能够计算出由线粒体之外活动所驱动的非线粒体呼吸耗氧。

(G) 第三次加药后下降：①呼吸潜力（spare respiratory capacity）：最大呼吸减去基础呼吸的耗氧。代表细胞对能量需求的潜在响应能力以及细胞基础呼吸与理论呼吸最大值间的差距，细胞响应需求的能力可作为细胞适应性或灵活性的指标。②non-mitochondrial oxygen consumption：加入 rotenone 和 antimycin A 后仍持续的耗氧，这是由一部分细胞酶继续耗氧产生的。该参数对于精确测量线粒体呼吸功能非常重要。

## (2) ECAR (Extracellular Acidification Rate)

ECAR 是指细胞外酸化速率，也可以理解为细胞产生的酸性代谢产物的释放速率。Seahorse 能量代谢分析仪通过测量培养基中 pH 值的变化来确定 ECAR。在测量过程中，细胞被置于特定的酸化试剂中，如葡萄糖和丙酮酸盐。这些试剂会导致细胞糖酵解过程中乳酸的产生，从而引起培养基 pH 值的变化。Seahorse 能量代谢分析仪通过测量培养基中 pH 值的变化，计算细胞的 ECAR。





(A) 第一次加药——Glucose: 实验第一次加入的药物是饱和浓度的葡萄糖, 细胞通过糖酵解途径利用该葡萄糖并将其分解为 pyruvate, 产生 ATP、NADH、水和质子。质子释放入胞外环境引起 ECAR 的迅速升高, 这种由葡萄糖诱导的细胞应答被称为细胞在基础条件下的糖酵解能力。

(B) 第一次加药后的上升——Glycolysis: 葡萄糖转化为丙酮酸的过程, 本实验中加入饱和浓度葡萄糖后细胞达到的 ECAR 值, 反映细胞在基础条件下的糖酵解能力。

(C) 第二次加药——Oligomycin: 实验第二次加入的药物为 oligomycin, 其为 ATP 合酶的抑制剂, 可抑制线粒体 ATP 产生, 从而将能量产生转移至糖酵解通路, 引起 ECAR 进一步升高, 反映了细胞最大的糖酵解能力。

(D) 第二次加药后上升——酵解容量 (Glycolytic capacity): 加入 oligomycin 后, 细胞达到的最大 ECAR 值, 指 oligomycin 有效关闭了氧化磷酸化功能后, 迫使细胞利用糖酵解达到的最大产生能量的能力。

(E) 第三次加药——2-DG (2-deoxy-glucose): 2-DG 是最后加入的药物, 该药通过竞争性结合糖酵解途径的己糖激酶而抑制糖酵解, 引起 ECAR 降低从而证实实验中 ECAR 的产生来源于糖酵解途径。

(F) 第三次加药后下降: ①酵解储备 (Glycolytic reserve): Glycolytic capacity 与 Glycolysis 的差值, 反映了细胞满足能量需求的能力, 以及糖酵解功能与细胞理论最大值之间的接近程度。②Non-glycolytic acidification: 细胞外酸化的其他来源, 非来自糖酵解途径。

## 二、 实验方法

## 2.1 细胞线粒体压力测试

- 1) 将 xx 细胞按实验设计接种于培养板，培养至细胞融合度约 50–70% 时进行转染。使用 Lipofectamine 3000 与 Opti-MEM 制备转染复合物。转染后继续培养（24 h 后进入检测）。300rpm 离心后上机检测；
- 2) 测试换液：吸掉 175ul 原生长培养基，利用 600uL 海马专用测试培养基润洗两次，最后加 450 uL 至 525 uL ，在显微镜下观察每孔内细胞的连续性，之后将它放置 non-CO2 培养箱孵育 1h；
- 3) 在每孔的四道加药槽中根据实验设计加药 75ul ，各种呼吸链抑制剂保存浓度及使用浓度：寡霉素（oligomycin）保存浓度 2.5mmol/L，使用浓度 1 $\mu$ mol/L； FCCP 保存浓度 2.5mmol/L ，使用浓度 1 $\mu$ mol/L；抗霉素 A (Antimycin A)保存浓度 2.5mmol/L ，使用浓度 1 $\mu$ mol/L。

### Plate Layout:

	1	2	3	4	5	6
A	BKG					
B				BKG		
C			BKG			
D						BKG

- 4) 仪器方法编辑及校准板校准；
- 5) 校准板换上细胞板运行。

## 2.2 细胞 ECAR 测试实验原理

- 1) 细胞处理及种细胞：同 2.1。
- 2) 测试换液：吸掉 175ul 原生长培养基，利用 600ul 海马专用测试培养基润洗两次，最后加 450ul 至 525ul ，在显微镜下观察每孔内细胞的连续性，之后将它放置 non-CO2 培养箱孵育 1 小时；



3) 药物使用浓度

Compound	Volume of assay medium	Resulting stock concentration
Glucose	3,000 $\mu$ L	100 mM
Oligomycin	720 $\mu$ L	100 $\mu$ M
2-DG	3,000 $\mu$ L	500 mM

Plate Layout:

	1	2	3	4	5	6
A	BKG					
B				BKG		
C			BKG			
D						BKG

4) 仪器方法编辑及校准板校准；

5) 校准板换上细胞板运行。