

利用安捷伦 Seahorse XF Flex 分析仪 测量基质包埋类器官的线粒体功能

前言

线粒体功能评估极大地增进了我们对代谢在细胞生理、疾病病理及病因中的核心作用的理解。随着更具生理相关性的三维 (3D) 模型越来越受关注，类器官已成为临床前研究的强大工具。通过更准确地再现真实器官的结构与功能特征，类器官克服了传统二维 (2D) 培养细胞乃至活体动物模型所面临的诸多局限性。值得注意的是，美国食品药品监督管理局 (FDA) 提出的减少动物试验的路线图强调了经过验证的新方法 (NAMs) 的重要性，其中包括使用类器官，以提高生物医学研究的转化相关性及伦理标准。

为了响应 FDA 以新方法为重点的优先发展事项，我们开发了一套检测工作流程，利用安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板 (XF Flex 类器官微孔板) 和安捷伦 Seahorse XF Flex 分析仪 (XF Flex) 来研究类器官培养物的能量代谢。XF Flex 类器官微孔板 (图 1) 包含一个 1 mm (高) × 4 mm (直径) 的样本池，可对包埋于基质胶 (如 Matrigel 或其他含有细胞外基质的水凝胶) 中的类器官持续培养数日，然后再进行安捷伦 Seahorse XF 检测或高分辨率成像分析。Seahorse XF Flex 类器官工作流程使研究人员能够利用更具生理相关性的模型获取关键代谢参数，这些参数是评估线粒体健康状况、毒性、糖酵解和整体细胞功能 (障碍) 的重要指标。

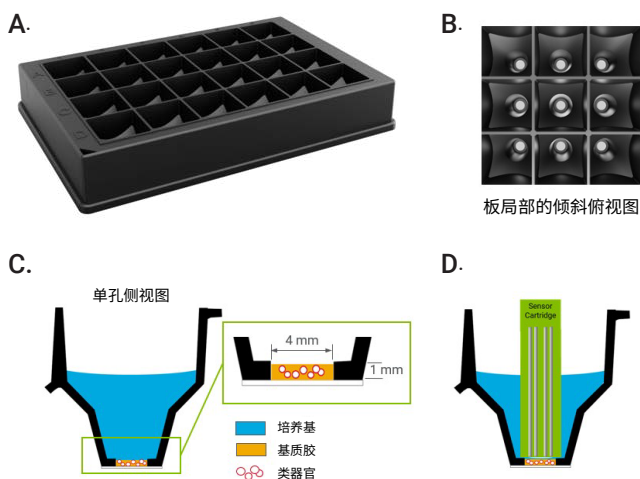


图 1. 安捷伦 Seahorse XF 类器官微孔板示意图，这是一款 24 孔板，采用黑色侧壁及透明薄孔底设计（A 和 B），可用于高分辨率成像。将类器官包埋在基质胶（如 Matrigel）中，在 1 mm（高）× 4 mm（直径）的样本池（C）中培养，每个孔内，传感器探针与样本池形成的微室可稳定容纳 $10 \pm 2 \mu\text{L}$ 基质（D）

本技术概述提供了在 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中构建类器官模型并维持培养，以及进行 Seahorse XF 检测的详细方案和指南，内容包括使用该工作流程进行类器官代谢特征分析的概念验证，以及关于数据归一化的注意事项及指导建议。鉴于类器官培养条件因样本来源和特性而异，用户应参照本指南对实验方案和操作流程进行优化。

基质胶中培养的类器官的 Seahorse XF Flex 检测工作流程

图 2 所示的实验工作流程概述了使用类器官样本进行 Seahorse XF 检测的关键步骤，包括从类器官制备到数据分析的整个过程。类器官可由单个细胞、现有类器官或组织片段在充满基质胶（如 Matrigel）的样本池中培养数天得到。在进行 Seahorse XF 检测的前一天，必须对传感器探针板进行水化处理。本工作流程的具体步骤将在后续章节中详细说明。用户可以根据使用的类器官类型、基质胶种类及研究目标对本流程进行适当调整。

在 XF Flex 类器官微孔板中制备类器官培养物

可以在 XF Flex 类器官培养板中，采用由体外获得的或从生物体或活检材料中分离出来的细胞或类器官，经培养得到用于实验的类器官。类器官的具体培养条件取决于用户的实验需求。因此，您可以根据类器官类型采用其他更合适的实验方案、基质胶类型及浓度。本文介绍的方案适用于 50%–100% Matrigel 中的类器官培养物。

将悬浮在 Matrigel 中的细胞或类器官，通过单步策略或两步策略接种到 XF Flex 类器官微孔板中（图 3）。第一种策略是直接向每个样本池中加入 $10 \mu\text{L}$ 细胞或类器官/Matrigel 悬液（图 3A）。该操作可手动完成，也可通过自动化生物打印设备

实验前数天

在 XF Flex 类器官微孔板中制备类器官培养物



实验前一天

准备实验



实验当天

准备化合物并进行 XF 检测



数据分析

数据/图像处理和归一化

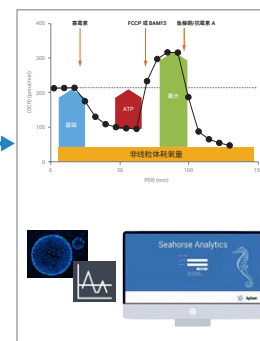


图 2. 使用安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板的 Seahorse XF Flex 类器官检测工作流程

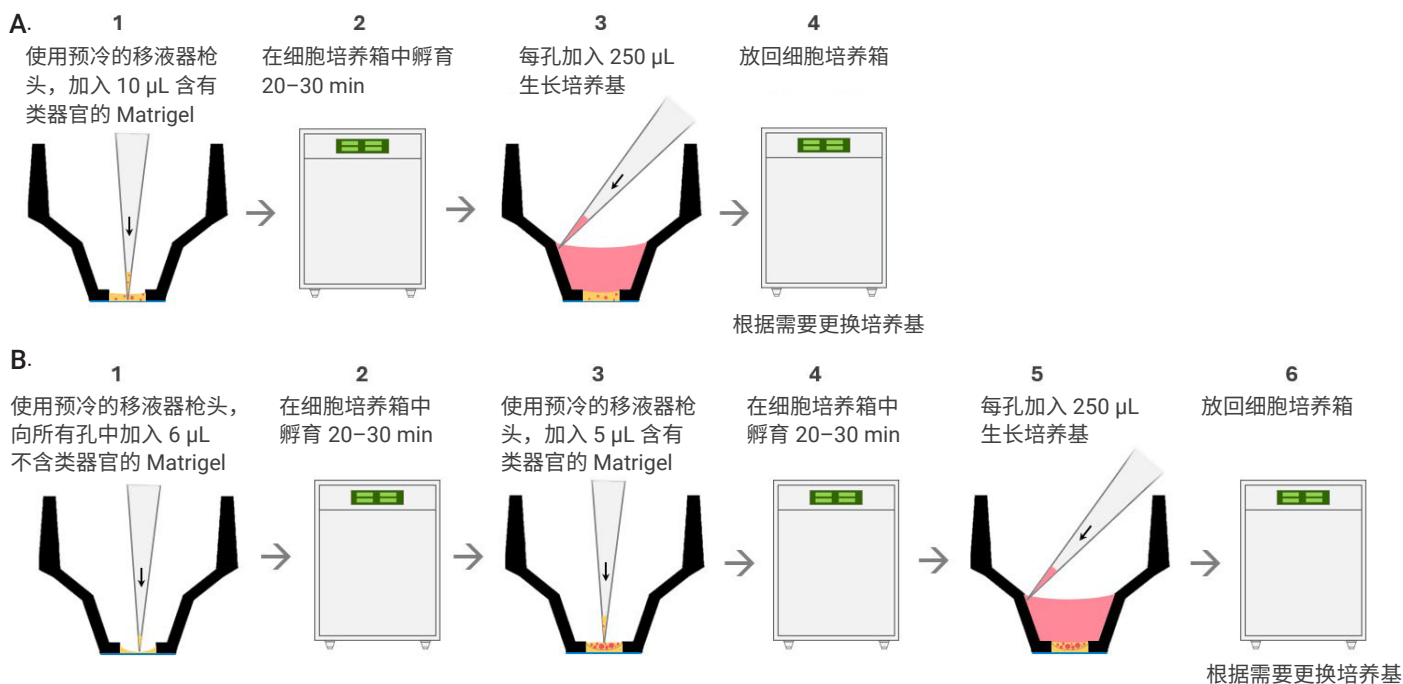


图 3. 类器官接种流程。A. 单步接种流程。B. 两步接种流程。对类器官进行连续培养，直至可以进行安捷伦 Seahorse XF 检测

实现。第二种策略需先使用纯基质胶进行预包被，再加入类器官材料（图 3B）。此策略可避免细胞在 Matrigel 基质胶下方发生非预期的二维生长，并防止类器官在孔板边缘聚集。

请按照以下步骤在 XF Flex 类器官微孔板中完成类器官培养。

单步接种流程

1. 将细胞或类器官重悬于用培养基或磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释的经预冷的 50% Matrigel 中。使用预冷的移液器枪头以维持低温，防止基质胶过早聚合
2. 小心地向每个孔的样本池中加入 10 μL Matrigel-细胞/类器官悬液。轻轻旋转移液器枪头，确保材料分布均匀。请勿向 A1 和 D6 孔中接种，这两个孔将作为 Seahorse XF 检测的背景孔
3. 按相同的方式向 A1 和 D6 孔中加入 10 μL 不含任何细胞或类器官的经稀释的 Matrigel
4. 将微孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 CO_2 的加湿培养箱中孵育 20–30 分钟，使 Matrigel 聚合
5. 向每个孔中轻轻地加入 250 μL 预热的生长培养基，以覆盖聚合的 Matrigel 及样本
6. 根据实验需求对类器官培养物进行维持培养。根据用户的具体类器官培养条件更换培养基

两步接种流程

1. 在每个孔的样本池中，加入 6 μL 稀释的 Matrigel，其中不含任何细胞或类器官。轻轻旋转移液器枪头，确保 Matrigel 均匀地涂覆在孔的底部和边缘
2. 将微孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 CO_2 的加湿培养箱中孵育 20–30 分钟，使 Matrigel 聚合
3. 使用预冷的移液器枪头，将细胞或类器官重悬于用培养基或 PBS 稀释的经预冷 Matrigel 中。小心地在已聚合的 Matrigel 层上方加入 4–5 μL Matrigel-细胞/类器官悬液。请勿向 A1 和 D6 孔中接种，这两个孔将作为 Seahorse XF 检测的背景孔
4. 按相同的方式向背景孔中加入 4–5 μL 不含任何细胞或类器官的经稀释的 Matrigel
5. 将微孔板再次置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 CO_2 的加湿培养箱中孵育 20–30 分钟，使上层 Matrigel 聚合
6. 向每个孔中轻轻地加入 250 μL 预热的生长培养基，以覆盖聚合的 Matrigel 层
7. 根据实验需求对类器官培养物进行维持培养。根据用户的具体类器官培养条件更换培养基

注：每个 Seahorse XF Flex 实验都需要至少两个背景孔（通常为 A1 和 D6）。因此，每次实验总共可以分析 22 个样本。背景孔中不得含有任何细胞或类器官，并且必须加入与样本孔中相同浓度和体积的 Matrigel。

类器官的来源和培养条件可能需要优化，以确保适配样本池，并且每个孔中用于包埋的基质胶量应为 $10 \pm 2 \mu\text{L}$ 。基质胶的类型和浓度可能因用户的实验方案和所用类器官的特性而有所不同。需要确保基质胶在 37 °C 的 Seahorse XF 分析过程中保持凝胶状态，且不会改变检测液的 pH 值。

实验前一天的准备工作

探针板水化

向水化板的每个孔中加入 1 mL XF 校准液，并将探针板和水化板组装好置于 37 °C、无 CO₂ 的培养箱中过夜。

注：打开 Seahorse XF Flex 分析仪，预热过夜，使温度稳定。

模板设计

Seahorse XF 检测模板包含仪器运行方案，用于指示 Seahorse 分析仪采集测量结果并执行加药操作。此外，它还包含实验设计信息（例如孔板布局），用于支持后续在安捷伦 Seahorse Analytics 中的数据转换。Seahorse XF 检测模板必须在开始实验之前准备好，可以使用安捷伦 Seahorse XF Flex 控制器或 Wave Pro 软件来完成。安捷伦 Seahorse Analytics（一款基于网页的工具）也可用于创建模板。

软件中提供了使用 XF Flex 类器官微孔板进行安捷伦 Seahorse XF 类器官线粒体压力测试（XF 类器官线粒体压力测试）的默认检测模板。在该模板中，仪器运行方案在每个测量循环内包含 3 分钟混合、0 分钟等待和 4 分钟测量（图 4）。总共包括 18 个循环（基线测量 3 个循环，加入寡霉素后 6 个循环，加入 FCCP 后 4 个循环，加入 Rot/AA 后 5 个循环）。不建议更改测量循环内的参数设置，但可根据需要调整测量循环数。

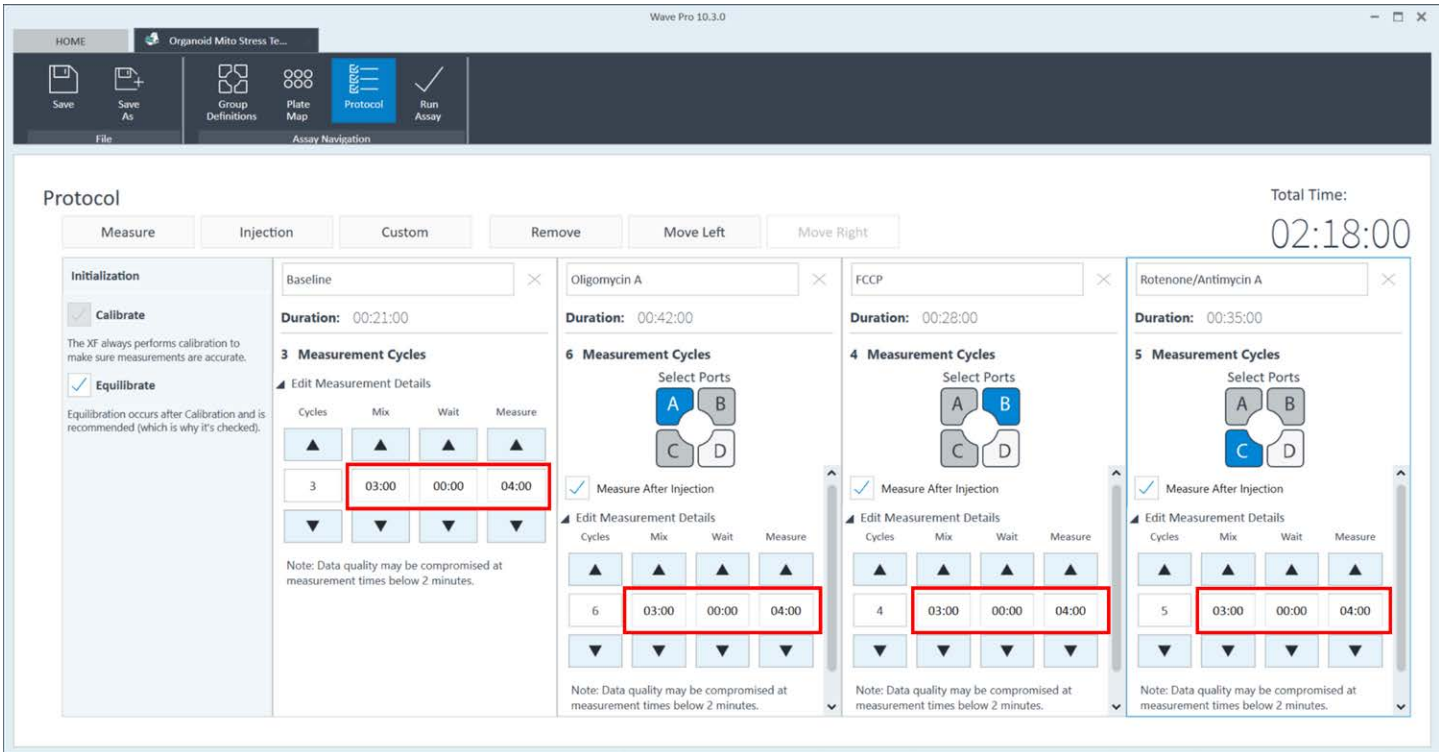


图 4. 默认的 XF 类器官线粒体压力测试模板中的安捷伦 Seahorse XF Flex 仪器运行方案

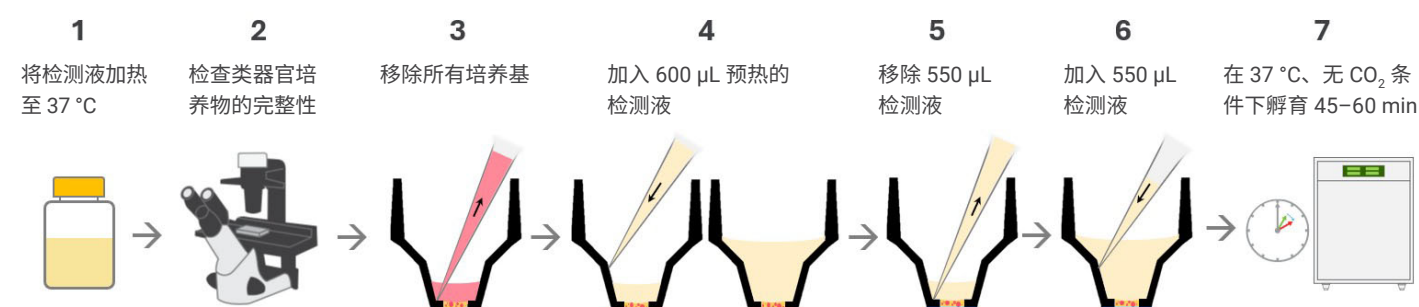


图 5. 将安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中的培养基替换为预热的安捷伦 Seahorse XF 检测液

例如，如果对线粒体调节剂的响应在预设的测量循环内没有达到最大值，则可能需要增加测量循环数，以获取完整响应曲线。

实验当天

配制检测液

根据表 1 配制检测液。当使用标准安捷伦 Seahorse XF 补充剂浓度时，不需要调节检测液的 pH。但可以根据需要更改检测液的组成。

表 1. 配制安捷伦 Seahorse XF 检测液

组分	体积 (mL)	最终浓度 (mM)
Seahorse XF DMEM 培养基, pH 7.4, 或 XF RPMI 培养基, pH 7.4	97	-
Seahorse XF 1.0 M 葡萄糖溶液	1	10
Seahorse XF 100 mM 丙酮酸钠溶液	1	1
Seahorse XF 200 mM 谷氨酰胺溶液	1	2

注：检测液或加药口中不应添加 BSA 和血清

准备 XF Flex 类器官微孔板

按照图 5 所示的操作，将类器官生长培养基替换为预热至 37 °C 的 Seahorse XF 检测液。

1. 将移液枪头靠在孔内侧壁上，吸取出生长培养基，注意不要触碰到类器官培养层（步骤 3）

2. 轻轻加入 600 µL 预热的 Seahorse XF 检测液（步骤 4）
3. 然后移除 550 µL Seahorse XF 检测液，然后再重新加入 550 µL XF 检测液（步骤 5 和 6）
4. 将 XF Flex 类器官微孔板置于 37 °C 无 CO₂ 培养箱中孵育 45-60 分钟（步骤 7），进行脱气处理

配制线粒体压力测试化合物溶液

注：化合物应在使用当天配制。丢弃所有剩余的化合物溶液。请勿冷冻和重复使用。

注：最后一次加样（例如 Rot/AA）的溶液可含有 10 µM Hoechst 33342（孔内终浓度为 1 µM），用于对细胞核进行染色，以便进行成像和数据归一化。

按表 2 中的体积，用预热的检测液溶解每个小瓶中的化合物。涡旋 30 秒或慢慢上下吸打溶液，使化合物完全溶解。所得储备液在上样至加药口前可能需要进行稀释，具体示例见表 3。每种试剂的最佳浓度可能因类器官的大小和类型而异。因此，建议进行浓度优化实验以确定最佳工作浓度，特别是对 FCCP，其在不同的类器官模型中可能表现出不同的响应。

表 2. 使用安捷伦 Seahorse XF 3D 线粒体压力测试试剂盒配制储备液

试剂	瓶盖颜色	添加的检测液体积 (mL)	加样溶液浓度 (X)	储备液浓度 (µM)	孔内终浓度 (µM)
寡霉素 A	蓝色	2.7	9	270	30
FCCP	黄色	2.7	10	200	20
Rot/AA	红色	2.7	11	110	10

表 3. 使用安捷伦 Seahorse XF 3D 线粒体压力测试试剂盒配制加样溶液。浓度和上样体积是按安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中每孔的起始体积为 600 μ L 来计算的

加样溶液	储备液 (μ L)	检测液 (μ L)	孔内浓度 (μ M)	加药口和体积
寡霉素 A (9 x)	1000	2000	10	加药口 A: 75 μ L
	2000	1000	20	
	2700	0	30	
FCCP (10 x)	750	2250	5	加药口 B: 75 μ L
	1500	1500	10	
	2250	750	15	
	2700	0	20	
*Rot/AA (11 x)	2700	0	10	加药口 C: 75 μ L

注：对于某些小型类器官，使用安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒 (103595-100) 即可获得最佳试剂浓度。在这些情况下，请按照安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒用户指南中的说明，配制检测液和加样溶液。

注：部分细胞或类器官对解偶联剂 Bam15 的解偶联响应比对 FCCP 的响应更好（例如 T 细胞、NK-T 细胞、MCF-10A 等）。针对这类样本，推荐使用安捷伦 Seahorse XF T 细胞代谢分析试剂盒 (103772-100)。

若需对实验进行调整，在加入寡霉素之前增加一次测试化合物加样操作（即 3D 线粒体压力测试（急性）），请将每孔的起始体积调整为 525 μ L，并按表 4 所示的体积进行加药口上样。

表 4. 配制用于调整后的实验的加样溶液。浓度和上样体积是按安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中每孔的起始体积为 525 μ L 来计算的

加样溶液	加药口浓度（倍数）	加药口和体积
测试化合物	8x	加药口 A: 75 μ L
寡霉素 A	9x	加药口 B: 75 μ L
FCCP	10x	加药口 C: 75 μ L
Rot/AA	11x	加药口 D: 75 μ L

加药口上样

- 从培养箱中取出组装好的传感器探针板与 Seahorse XF 水化辅助板及水化板。将探针板倒置于水化板旁边。用一只手稳稳按住水化板，用另一只手从一个角抬起水化辅助板，将其取下
- 按照表 3 或表 4 所示，将加样溶液小心地加入相应的加药口

- 目视检查加药口加药是否均匀。液体应该在加药口中。确保探针板顶部没有残留液滴

执行 Seahorse XF 检测

注：测量循环必须由 03:00 分钟混合、00:00 分钟等待和 04:00 分钟测量三个阶段组成（图 4）。

- 从可用模板列表中选择正确的检测模板，并按照仪器提示进行操作
- 检查实验的分组（细胞类型或条件）、孔板布局图和仪器运行方案，可根据需要进行调整
- 单击 **Start Run**（开始运行），开始 Seahorse XF 检测
- 出现提示时，请取下探针板盖子，然后将带有水化板的已加药的传感器探针板置于热托盘上。确保探针板的放置方向正确，盖子已取下。然后，单击 **I'm Ready**（准备完毕）。校准大约需要 15 至 30 分钟
- 校准完成后，单击 **Open Tray**（打开托盘）以弹出水化板，然后放入细胞板。放入细胞板前确保盖子已取下
- 单击 **Load Cell Plate**（加载细胞板）开始运行检测

注：完成 Seahorse XF 检测后，可通过成像或其他方法对类器官样本进行进一步处理，以定量每孔中的类器官数量，用于数据归一化。更多信息详见本文末尾的数据归一化部分。

数据分析

Seahorse 检测结果文件可以上传到 Seahorse Analytics 进行进一步的数据分析。图 6 显示了 Standard Companion View（标准助手视图）中的典型 OCR 动力学曲线图。Seahorse XF 类器官微孔板仅适用于特定的安捷伦 Seahorse XF 检测（参见材料和设备部分表 5）。用户只能通过测量细胞外酸化率 (ECARs) 来评估糖酵解水平。由于 Matrigel 会引起质子扩散速率变化，因此无法使用 XF Flex 类器官微孔板生成的数据计算 PER 或 glycoPER。

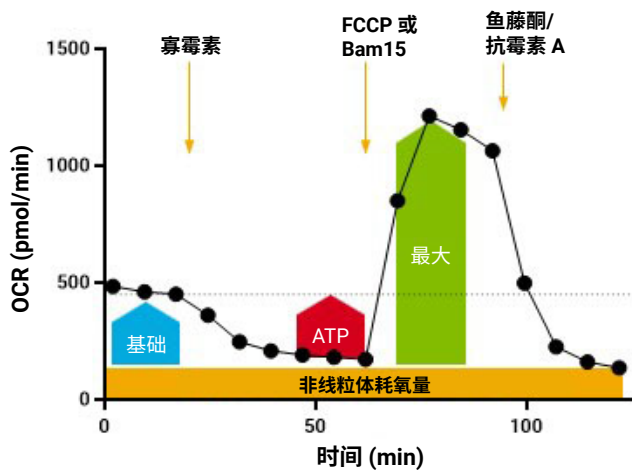


图 6. 使用类器官培养物进行安捷伦 Seahorse XF 线粒体压力测试的示意图

材料和设备

表 5. XF 类器官工作流程中使用的材料和设备

材料	供应商	货号
Seahorse XF Flex 分析仪	安捷伦科技公司	S7851A 或 S7851AN
Seahorse XF Flex 类器官 FluxPak		103866-100
Seahorse XF Flex 类器官微孔板		103865-100
Seahorse XF 3D 线粒体压力测试试剂盒 ¹		103016-100
Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒 ²		103015-100
Seahorse XF DMEM 检测液包, pH 7.4		103680-100
BioTek Cytation 细胞成像多功能微孔板检测系统		
Matrigel 基质	Corning	356231
细胞回收溶液	Corning	354253
小鼠肝祖细胞类器官	STEMCELL Technology	70932
HepatiCult 类器官生长培养基 (小鼠)	STEMCELL Technology	06030
DMEM/F-12, 含 15 mM HEPES	STEMCELL Technology	36254
HCT116-H2B-GFP		
DMEM	Gibco	11995-065
Hoechst 33342	Thermo Fisher	62249

- 某些细胞类型对 Bam15 的解偶联响应比对 FCCP 的响应更好 (例如 T 细胞、NK-T 细胞、MCF-10A)。对于由这些细胞组成的类器官, 可以使用安捷伦 Seahorse XF T 细胞代谢分析试剂盒 (103772-100)
- 对于不需要高化合物浓度的小型类器官, Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒 (103595-100) 可作为一种备选方案
- 关于 Seahorse 检测的更多信息, 请参阅 [Seahorse XF 检测试剂盒与试剂产品样本](#)

应用

肝脏类器官: 单步接种流程

对小鼠肝祖细胞类器官 (STEMCELL, 货号 70932) 生成的功能性类器官进行了代谢表型分析。简而言之, 按照制造商的说明将类器官片段重悬于 100% Matrigel 中进行传代培养, 然后采用一步接种流程, 按 10 μ L/孔的体积将 Matrigel-类器官悬液加入 XF Flex 类器官微孔板中 (图 3A)。三天内即可形成稳定的球形类器官, 并且接种后五天内均可使用。图 7 显示了培养三天的小鼠肝脏类器官的 Z 轴叠加明场和荧光图像。

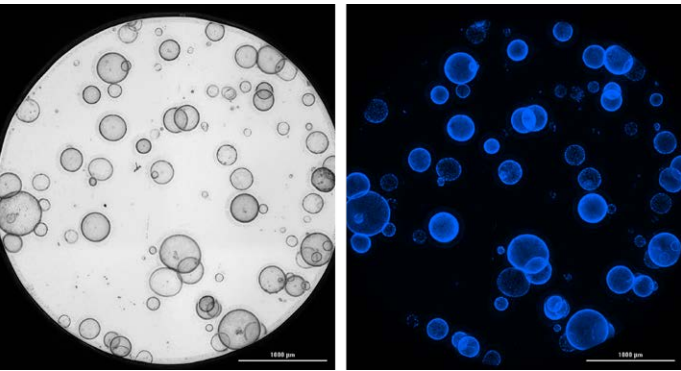


图 7. 在安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中培养三天的小鼠肝脏类器官。在 XF 线粒体压力测试后, 使用安捷伦 BioTek Cytation 细胞成像系统, 通过 Gen5 软件程序 (包括在 800 μ m 厚度内进行 Z 轴层切图像采集, 共采集 5 张图像, 然后进行 Z 轴叠加) 采集的明场 (左) 和荧光 (右) 图像。在检测的最后一步中, 将 Hoechst 33342 与鱼藤酮/抗霉素一起加入

图 8 显示了不同 FCCP 浓度下的典型 XF 线粒体压力测试结果。数据明确证实了使用 XF Flex 类器官微孔板和 XF Flex 分析仪进行代谢分析的可行性, 所有调节剂均获得了显著的代谢响应。FCCP 浓度优化实验表明, 4 μ M 是加入解偶联剂后产生最大 OCR 的最佳浓度。寡霉素和鱼藤酮/抗霉素 A 的最佳浓度分别为 1.5 μ M 和 0.5 μ M (数据未显示)。请注意, 对线粒体调节剂的最大响应不会立即达到, 尤其是寡霉素, 在六个测量循环后仍未达到平台期。因此, 加入寡霉素后, 总共进行了八个测量循环, 以确保准确评估 ATP 关联 OCR 及其他参数。这种现象经常发生, 主要是因为 Matrigel 会延缓化合物向类器官的渗透。

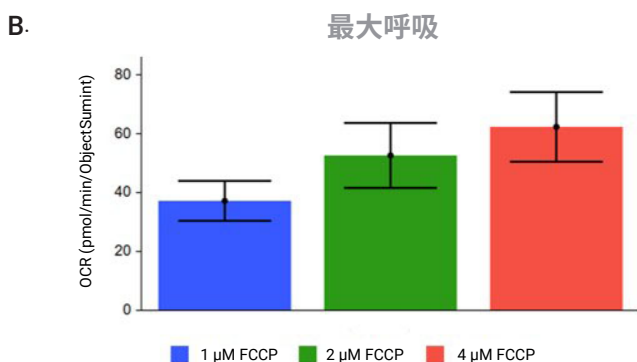
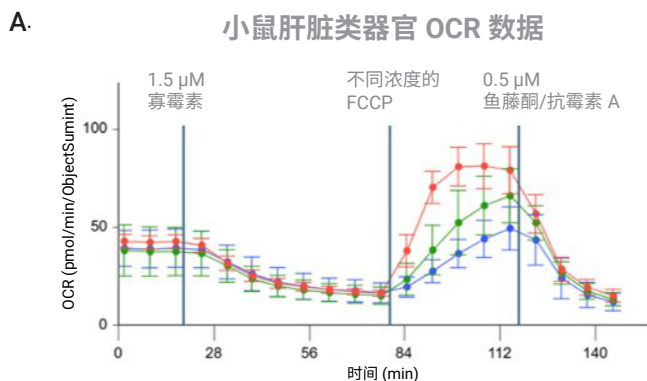


图 8. 小鼠肝脏类器官的 FCCP 浓度优化实验。A. OCR 动力学曲线图，响应随 FCCP 浓度增加而增加。B. 图 A 中的最大呼吸值。OCR 数据通过 Hoechst 33342 核染色的总荧光信号强度 (ObjectSumInt) 进行归一化，该强度由安捷伦 BioTek Cytation 细胞成像系统测得。有关方法的详细信息，请参阅“数据归一化”部分

来源于癌细胞的类器官：两步接种流程

肿瘤类器官培养可以从体外培养的原代细胞或组织活检样本开始。本示例采用 HCT116-H2B-GFP 细胞系，在 XF Flex 类器官微孔板中用 Matrigel 培养 5–6 天。简而言之，将细胞重悬于预冷的生长培养基中，密度为 1×10^5 至 5×10^5 个细胞/mL，并与 Matrigel 以 1:1 的比例混合（50% Matrigel，最终蛋白质浓度约为 5 mg/mL）。按照两步接种流程（图 3B），取 5 μ L 混合物加入每个孔中预铺的 Matrigel 层上，最终接种密度为 500–2000 个细胞/孔。图 9 显示了在 XF Flex 类器官微孔板中以 1000 个细胞/孔的接种密度培养五天的类器官图像。培养体系中可见多个类器官，大小从 50–150 μ m 不等。这类类器官培养物（体积小且大小相对一致）对低浓度线粒体调节剂（1.5 μ M 寡霉素和 0.5 μ M 鱼藤酮/抗霉素混合液）表现出较好的响应性。

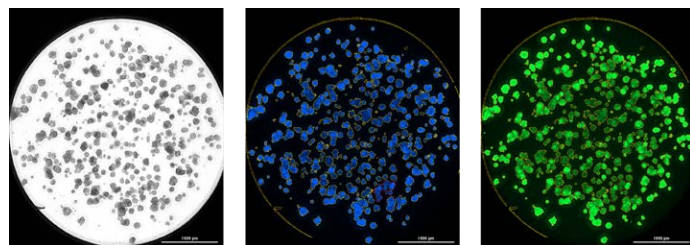


图 9. 在安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中培养五天的 HCT116-H2B-GFP 类器官。在 XF 线粒体压力测试后，使用安捷伦 BioTek Cytation 细胞成像系统，通过 Gen5 软件程序（包括在 800 μ m 厚度内进行 Z 轴层切图像采集，共采集 5 张图像，然后进行 Z 轴叠加）采集的明场（左）和荧光（中、右）图像。在检测的最后一步中，将 Hoechst 33342 与鱼藤酮/抗霉素 A 一起加入

在 FCCP 浓度优化实验中，评估了 0.25 μ M 至 4 μ M 范围内的六个浓度。利用通过明场图像获得的总目标面积对数据进行归一化（详情请参见数据归一化部分）。如图 10 所示，在所测试的浓度范围内，观察到 OCR 对 FCCP 的响应呈典型的钟形，并且在 1 μ M FCCP 时获得了最大响应。

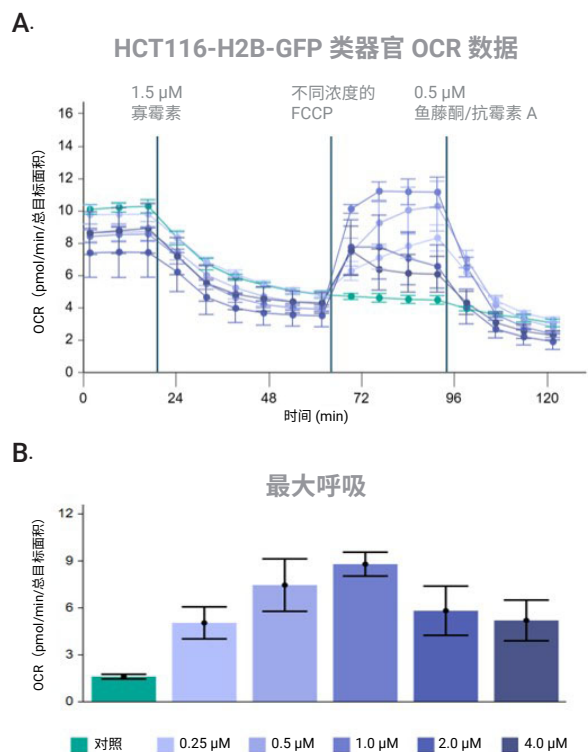


图 10. 在安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板中培养的 HCT116-H2B-GFP 类器官的 FCCP 浓度优化实验。将 HCT116-H2B-GFP 细胞以每孔 1000 个细胞的密度接种/包埋在 11 μ L 50% Matrigel 中，然后培养 5 天。A. OCR 动力学曲线图，以明场图像获得的总目标面积进行归一化。B. 由安捷伦 Seahorse Analytics 软件计算得出的最大呼吸

图 11 中的数据展示了利用类器官培养物来评估靶向线粒体功能的化合物的效果。众所周知，二甲双胍能够抑制线粒体呼吸。如图所示，将类器官培养物过夜暴露于二甲双胍，会导致癌细胞类器官的线粒体呼吸出现浓度依赖性抑制。

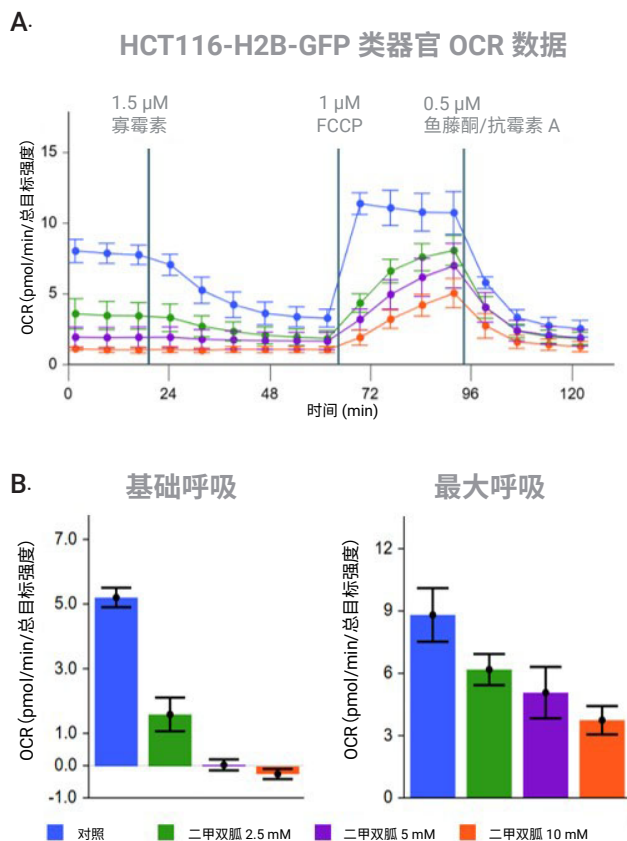


图 11. 二甲双胍对 HCT116-H2B-GFP 癌细胞类器官线粒体呼吸的影响。将 HCT116-H2B-GFP 细胞在 Matrigel (5 mg/mL 蛋白质) 中培养 6 天，然后以 2.5、5 或 10 mM 二甲双胍过夜处理，再进行 XF 线粒体压力测试。使用安捷伦 BioTek Cytation 细胞成像系统，通过 DAPI 通道测量经 Hoechst 33342 染色后的总荧光信号强度，对 OCR 数据进行归一化

数据归一化

类器官培养通常需要数天时间，其中包括复杂的生长和分化阶段，这可能导致不同孔之间的类器官数量、大小和形态学特征存在较大差异。由于无法对单个细胞进行计数，因此需要采用针对类器官的样本定量方法，以实现数据归一化。本文介绍了两种可广泛应用于各种类器官模型的方法。第一种是基于图像的方法，它使用通过 Z 轴叠加明场图像获得的目标面积之和(总目标面积)或在该区域内的总荧光信号强度(总目标

强度)来量化孔中类器官的总量。第二种方法是酶学检测方法，在 Seahorse XF 检测结束时，采用细胞活力检测(例如 Promega 的 CellTiter-Glo 细胞活力检测)来确定孔内的活细胞数量。

利用基于成像的方法进行类器官定量

显微成像是一种普遍适用的样本大小/数量估算方法。图 12 显示了使用通过 Cyation 细胞成像多功能微孔板检测系统获得的 4x 高对比度明场(HCBF)和荧光图像来识别类器官。总共采集了五张不同焦平面的图像，并将它们叠加到一张平面图像上(图 12A)，同时采集并叠加了 Hoechst 33342 图像(图 12B)。采用 Gen5 软件对类器官进行识别，如图 12B 中的黄色边界线所示。可以将所有类器官的总面积(总目标面积)作为分母，对实验数据进行归一化。为了反映各类器官中的细胞密度差异，可测量目标边界内的总荧光信号强度(总目标强度)，如图 12B 所示。

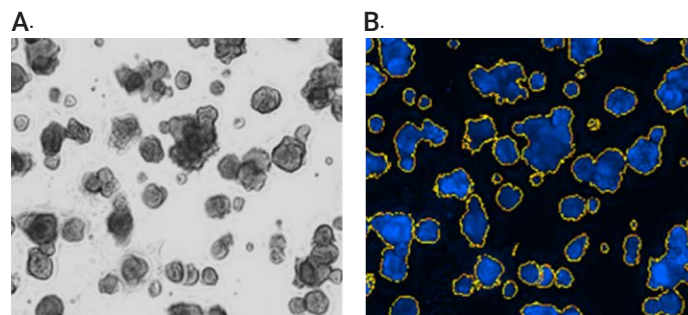


图 12. 基于图像的类器官识别和荧光强度检测示例。A. 由五个 Z 轴层切图像通过叠加得到的明场图像。根据该叠加图像确定目标及其边界。B. 同一孔的荧光图像，经 Hoechst 33342 核染料染色。黄线表示由 Z 轴叠加明场图像确定的目标边界。边界内的荧光强度可通过 Gen5 软件进行量化

利用活力检测法进行类器官定量

发光法 ATP 定量是一种广泛应用于评估细胞活力的方法，其原理是测量与 ATP 水平成正比的发光信号。CellTiter-Glo 2.0 细胞活力检测试剂盒(Promega, 货号 G9241)与 CellTiter-Glo 3D 细胞活力检测试剂盒(Promega, 货号 G9681)是常用的两款试剂盒。为了评估包埋在基质胶(如 Matrigel)中的样本的活力，需要在 Seahorse XF 检测后执行相应的操作，包括溶解基质、回收样本，然后再进行细胞活力检测。

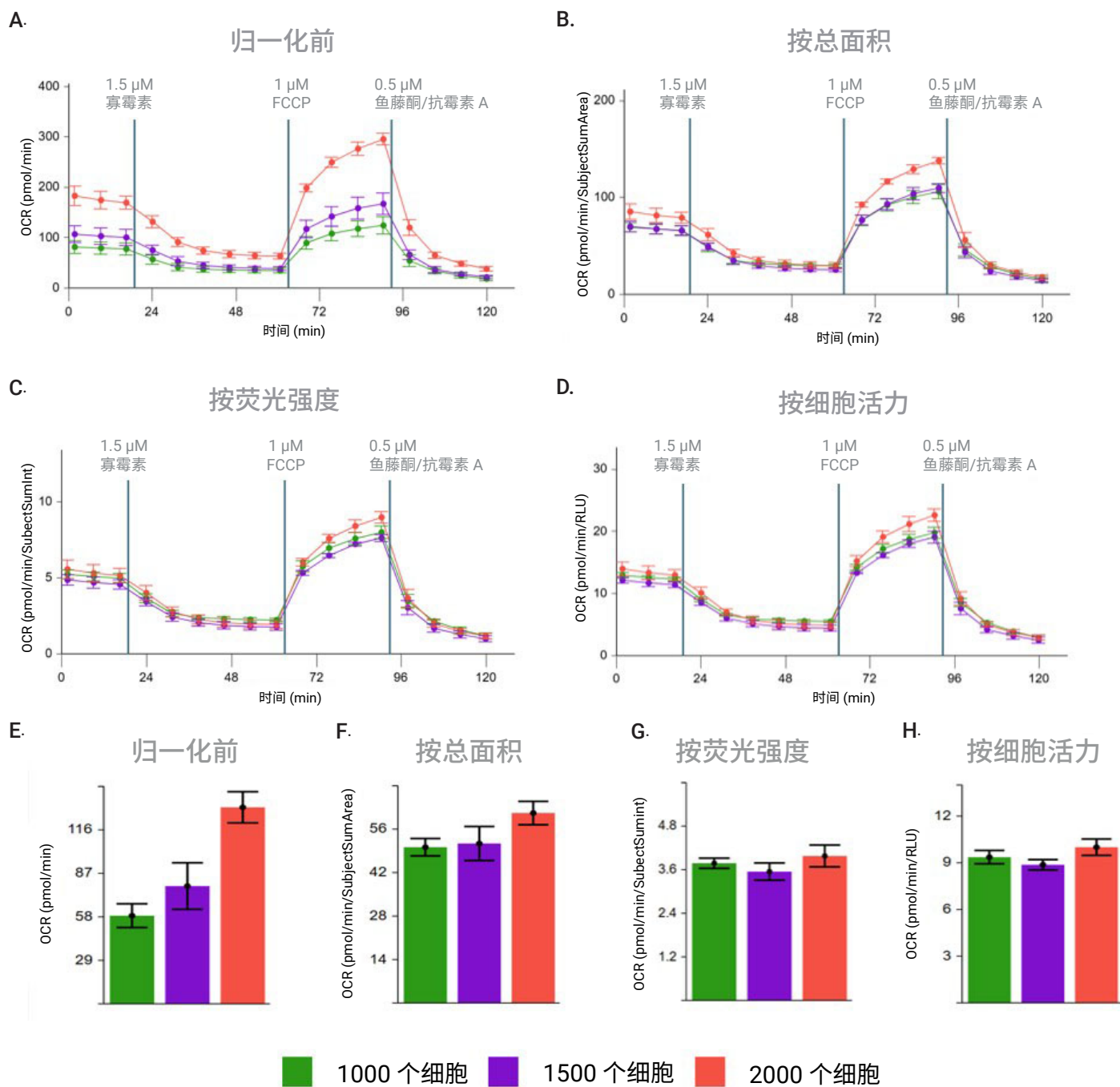


图 13. 归一化方法比较：按总目标面积 (ObjectSumArea)、总荧光信号强度 (SubjectSumInt) 和 CellTiter-Glo 2.0 细胞活力检测 (RLU) 测得的活力结果进行归一化。A-D. 归一化前后的动力学 OCR 图。E-H. 归一化前后的基础 OCR

本研究测定了类器官样本活力，流程简述如下，结果以相对发光强度表示。根据具体类器官类型和所用基质胶的不同，可能需要进一步优化方法。

1. Seahorse XF 检测结束后，彻底去除 XF 检测液，如图 5 步骤 3 所示
2. 加入 30 μ L 预冷的 Corning 细胞回收溶液或类似的 Matrigel 溶解试剂
3. 将微孔板置于冰上或在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟
4. 加入 160 μ L Seahorse XF 检测液或 PBS，然后用移液器反复吹打，从 Matrigel 中回收类器官
5. 加入 200 μ L CellTiter-Glo 工作试剂，充分混匀，并在室温下孵育 10 分钟
6. 使用微孔板检测仪读取 XF Flex 类器官微孔板中的发光强度

归一化方法选择

归一化方法的选择应遵循以下原则：类器官的特性和具体的研究目标。上文介绍的两种方法无法对类器官进行绝对细胞计数，这限制了不同独立实验之间的数据可比性。为解决这个问题，建议在每次实验中设置一个参考对照组，或在条件允许的情况下采用标准曲线法。为确保实验结果的可靠性与重现性，可能需要对归一化策略进行进一步优化与改进。

在图 13 所示的示例中，应用了上述讨论的三种数据归一化方法。这些方法均有效降低了因样本大小/数量差异导致的孔间变异。本示例中，三个实验组代表了由三种不同的初始接种密度（1000、1500 和 2000 个细胞/孔）构建的 HCT116-H2B-GFP 类器官，然后使用 1.5 μ M 寡霉素、1 μ M FCCP 和 0.5 μ M 鱼藤酮/抗霉素 A 进行 Seahorse XF 线粒体压力测试。HCT116-H2B-GFP 类器官的基础 OCR 随接种密度增加而升高（从 80 到 180 pmol/min）。归一化后，不同接种密度下的基础 OCR 信号彼此之间的差异在 15% 以内（图 13 E 至 H）。这三种归一化方法均显著降低了 OCR 变异性，可以用于数据归一化。

结论

本技术概述介绍的安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官工作流程，是基于 Seahorse XF 技术推出的工具库中的创新解决方案，使研究人员能够将实时代谢分析扩展到传统的二维培养细胞之外的其他模型。该工作流程采用安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官微孔板，能够对基质包埋的类器官进行多日培养，并在代谢分析和高分辨率成像过程中牢固固定类器官（或其他 3D 样本）。如本文中的案例所示，该流程操作便捷，适用于多种类器官类型，并且可以获得可靠的代谢测量结果。凭借此项新功能，Seahorse XF 技术将赋能广泛的生物医学研究，催生更多具有生理相关性的科学发现。

鉴于不同用户在类器官来源、培养方法和研究目标方面存在差异，强烈建议在常规开展该检测之前进行方法优化。遵循本技术概述中的实验指南，将有助于确保获得可靠且可重现的结果，以满足特定的实验需求。

本应用中使用的产品

安捷伦产品

安捷伦 Seahorse XF Flex 分析仪 [↗](#)

安捷伦 Seahorse XF Flex 类器官 FluxPak [↗](#)

安捷伦 Seahorse XF Flex 3D 线粒体压力测试试剂盒 [↗](#)

安捷伦 Seahorse XF Flex 细胞线粒体压力测试试剂盒 [↗](#)

安捷伦 Seahorse XF DMEM 检测液包 [↗](#)

安捷伦 BioTek Cytation 成像多功能微孔板检测系统 [↗](#)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA260112.584

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025，2026

2026 年 6 月 10 日，中国出版

5994-8742ZHCN