

线粒体功能检测 技术手册

MITOCHONDRIAL FUNCTION TEST TECHNICAL MANUAL

技术引领医学转化 专业创造行业口碑

广州奥科生物医学科技有限公司

目录

一、技术背景摘要	2
二、实验材料	2
1. 实验仪器及耗材.....	2
2. 实验试剂.....	2
三、实验步骤	2
1.线粒体功能测定准备（实验第一天）	2
2.临床样本准备（实验第二天）	3
3.线粒体功能测定实验培养基的制备(约 10 min).....	4
3.1 功能液制备（10 min 左右）	4
3.2 为 Mito 压力测试准备 PBMCs（大约持续 2 h）	4
3.3 运行 Mito 压力测试.....	5
4.线粒体功能数据归一化.....	5

线粒体功能检测

——癌因性疲乏相关线粒体功能检测

一、技术背景摘要

线粒体是重要的细胞器，通过氧化磷酸化为细胞提供95%的能量，在钙信号、细胞凋亡、免疫信号和其他细胞内信号转导中起重要作用。最新研究表明线粒体生物能障碍和能量产生缺陷可能导致疲乏。线粒体在能量生产和氧化应激中的中心作用表明，利用线粒体功能作为研究疲乏性癌症患的指示具有潜在的实用价值。利用紧凑的细胞外流量系统 (Extracellular flux system) 和连续注射呼吸抑制剂，通过测量基本的线粒体呼吸 (Basal mitochondrial respiration)、空余呼吸能力 (Spare respiratory capacity) 和应对应激反应的首选能量代谢表型来检测PBMC线粒体功能状态，可以准确评估细胞中与疲乏相关的线粒体功能障碍。

二、实验材料

1. 实验仪器及耗材

高速离心机，无二氧化碳37 °C恒温培养箱，XFp Fluxpak (微孔板以及传感器盒; 103022-100; Agilent), Seahorse XFp Analyzer细胞外流量分析仪 (S7802AEA; Agilent), pH计, 平板阅读器 (BTCYT5PV; BioTek), 涡旋混合器, 移液枪, 单核细胞准备管 (362761; BD Biosciences), 15 mL锥形管, EP管等。

2. 实验试剂

Calibrant solution (103059-000; Agilent), PBS, RPMI-1640, 胎牛血清, 10 mM青霉素/链霉素, 0.1 M碳酸氢钠pH 8.0, Cell-Tak (354240; Corning), DMEM培养基 (不添加任何碳酸氢钠、葡萄糖、谷氨酰胺或丙酮酸钠), XF base media (103335-100; Agilent), L-谷氨酰胺, 丙酮酸, 葡萄糖, Mito应力试剂盒 (103010-100; Agilent), CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay (C35011; ThermoFisher)。

三、实验步骤

1. 线粒体功能测定准备 (实验第一天)

1.1 水合传感器盒

- 1) 从XFp Fluxpak探针板上移除Sensor Cartridge, 添加200 μ L Calibrant solution (103059-000; Agilent)至utility plate的每个孔中, 然后用400 μ L Calibrant solution填满周围空隙。
- 2) 将Sensor Cartridge放回utility plate, 将其浸入Calibrant solution中, 在37 °C无CO₂培养箱中过夜。

注意: 水合传感器盒至少需要4 h, 最多72 h。

2.临床样本准备 (实验第二天)

2.1 使用13-item Functional Assessment of Chronic Illness Therapy – Fatigue (FACIT-F)来测量疲乏基线(体外放射治疗EBRT开始前), EBRT后中点和完成, 以及EBRT结束后1天。

- 1) 对每一项的回答使用0-4的等级, 0表示“一点也不”, 4表示应答者与相应的陈述“非常相关”。总分应在16-53分之间, 较低的分数反映了较高的疲乏强度。
- 2) 将疲乏定义为FACIT-F评分低于43, 而FACIT-F评分 \geq 43表示无疲乏或无临床意义的疲乏。

注: 43分的FACIT-F分数最能区分癌症患者和普通人群的疲乏程度。

- 3) FACIT疲乏评分表中包括以下13项: 1) 感到疲乏;; 2) 觉得浑身无力; 3) 觉得无精打采(“筋疲力尽”); 4) 觉得累了; 5) 因为劳累所以做事情有困难; 6) 因为劳累很难把事情做完; 7) 精力充沛; 8) 可以做日常活动; 9) 白天需要睡觉; 10) 累得吃不下饭; 11) 进行日常活动需要帮助; 12) 因为太劳累不能做我想做的事而感到沮丧13) 因为劳累必须限制社交活动。

2.2 从新鲜采集的血液样本中分离PBMC (大约持续1 h)。

- 1) 收集8 mL血液到一个单核细胞准备管。
- 2) 注:血样采集后2 h内处理。如果血样采集后超过2 h处理, PBMCs的质量可能会受到影响。
- 3) 室温(18-25 °C), 1750 g, 离心30 min。将混浊层转移到15 mL的锥形管中。加入15 mL PBS, 颠倒5次混匀。
- 4) 4 °C条件下, 300 g离心15 min。小心地取出和丢弃上清液, 不要干扰细胞团块。加入10 mL PBS重新悬浮细胞团块, 颠倒5次混匀。
- 5) 4 °C, 300 g, 离心10 min。弃液体上清, 将细胞重新悬浮于1 mL PBS中。将PBMCs转

移到1.5 mL的微管中。

- 6) 610 g离心10 min。仔细地取出上清液，用完整的RPMI-1640混液（RPMI-1640补充10%胎牛血清，10 mM青霉素/链霉素）重悬细胞团块。

2.3 非贴壁细胞涂布细胞板（约持续30 min）。

- 1) 用0.1 M碳酸氢钠pH 8.0稀释Cell-Tak原液，制备细胞和组织粘附工作液。工作液应保持 $3.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的面积。
- 2) 注：该溶液含有从海洋贻贝（*Mytilus edulis*）中提取的多酚蛋白。这些蛋白质是贻贝分泌的黏胶的关键成分，黏胶的作用是将贻贝固定在表面上。我们发现Cell-Tak与PBMCs的结合效果最好。
- 3) 向XFp PS组织培养微孔板每个平板孔中添加100 μL 稀释好的细胞和组织粘附工作液，室温下孵育至少20 min。用去离子水洗三次，然后风干。

3.线粒体功能测定实验培养基的制备(约10 min)

3.1 功能液制备（10 min左右）

注意:实验当天必须准备好新鲜的功能液。

- 1) 在XF base media（与DMEM培养基成分一致，不添加任何碳酸氢钠、葡萄糖、谷氨酰胺或丙酮酸钠）中添加L-谷氨酰胺、丙酮酸和葡萄糖制备功能液。将功能液加热到 37°C ，然后将pH调整到7.4。

注：L-谷氨酰胺、丙酮酸和葡萄糖的浓度通常与正常生长培养基中的浓度相同，但可根据试验进行调整。

3.2 为Mito压力测试准备PBMCs（大约持续2 h）

- 1) 将步骤2中分离的PBMCs加入到每个孔中，使其达到80%-90%的克隆率。根据我们的经验， 1.5×10^5 个细胞/孔产生了最为一致的结果。

注：A孔和H孔为背景孔，应仅含不含细胞的功能液。在B孔至G孔中，我们建议每个病人样本至少铺板3-6孔，以考虑异常值。

- 2) 将平板以200 g的速度旋转2 min，让细胞附着在孔的底部。用功能液清洗细胞一次。这个步骤从生长培养基中去除血清和碳酸氢钠。

注意:根据我们的经验，清洗步骤通常会去除20%-30%的细胞。

- 3) 添加180 μL 功能液到每个孔中,包括背景A孔和H孔。 37°C 无 CO_2 培养箱中孵育45-60 min

。

3.3 运行Mito压力测试

3.3.1 将Mito应力试剂盒 (103010-100; Agilent) 中的药物用功能液重新配制如下:

- 1) 寡霉素: 添加252 μL 功能液生成50 μM 母液。
- 2) FCCP: 添加288 μL 功能液生成50 μM 母液。
- 3) 抗霉素A/鱼藤酮: 添加216 μL 功能液生成25 μM 母液。

3.3.2 漩涡重新配置的药物母液约1 min并稀释成工作溶液。

注意: 根据细胞类型, 工作溶液的浓度应在实验前进行滴定和预先测定。对于PBMCs, 我们发现1 μM 寡霉素, 1 μM FCCP和0.5 μM 抗霉素A /鱼藤酮工作液最好。

3.3.3 将药物按顺序移入传感器盒内的每个端口:

- 1) A口: 移入20 μL 10 μM 寡霉素, 每个孔终浓度为1 μM 。
- 2) B口: 移入22 μL 10 μM FCCP, 每个孔终浓度为1 μM 。
- 3) C口: 移入25 μL 5 μM 抗霉素A /鱼藤酮, 每个孔终浓度为0.5 μM 。

3.3.4 在细胞外流量仪 (S7802AEA; Agilent) 上选择“Mito压力测试”。根据仪器提示, 插入传感器盒。该仪器将自动进行传感器校准。传感器校准后插入细胞板, 仪器将完成剩余的检测工作。在530 nm (激发) /650 nm (发射) 下测量氧动力学, 在470 nm (激发) /530 nm (发射) 下测量质子浓度。

4. 线粒体功能数据归一化

4.1 制备细胞增殖测定液 (约5 min)。

- 1) 添加48 μL 核酸染色 (500 x) 和240 μL 背景抑制剂到11.7 mL PBS中 (2 x)。核酸染色剂是一种细胞渗透的DNA结合染料, 而背景抑制剂是一种掩蔽染料, 它能阻止死亡细胞或细胞膜完整性受损的细胞被染色。DNA结合染料和背景抑制剂的组合确保只有活细胞被色。
- 2) 直接在完成Mito压力测试的每个细胞孔中添加相同体积的2 x工作液 (180 μL)。

4.2 在37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育45-60 min。在508 nm (激发) /527 nm (发射) 的平板阅读器上量化活细胞 (荧光) 数量, 并将OCR (耗氧率) 数据归一化 (大约持续10 min)。

注: 除活细胞数外, 用户还可选择用细胞总数、核酸量、蛋白浓度等对数据进行归一化处理

。