

在安捷伦 Seahorse XF Pro M 细胞培养微孔板中接种贴壁细胞

前言

采用安捷伦 Seahorse XF Pro M 细胞培养微孔板配合安捷伦 Seahorse XFe96/XF Pro 探针板进行安捷伦 Seahorse XF 分析。每个微孔板包含典型的 96 孔和 4 凹槽孔设计。该流程描述了在使用安捷伦 Seahorse XF Pro 分析仪进行 Seahorse XF 分析时，可获得理想结果的贴壁细胞接种建议。

基本的细胞接种工作流程

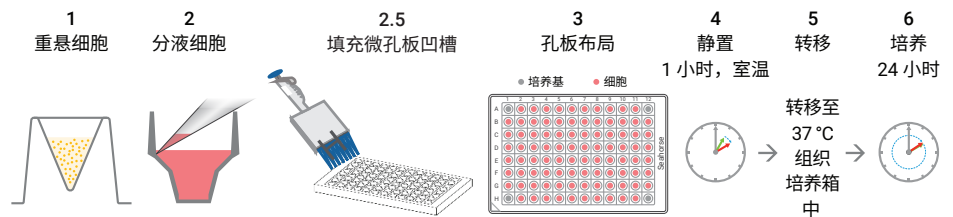


图 1. Agilent Seahorse XF 组织培养微孔板细胞接种工作流程

1. 收集细胞并将其重悬至所需的最终浓度，以便接种至 80 μL 生长培养基中。有关配制常用细胞接种密度的信息，请参考下表。可以 1) 将细胞悬浮液稀释至 1×10^6 个细胞/mL，并根据下表再次稀释至所需密度，或 2) 使用公式 1 将细胞悬浮液稀释至所需细胞密度，其中“细胞”为细胞数，“体积”的单位为 mL

公式 1: $\text{细胞}_{\text{储备}} \times \text{体积}_{\text{储备}} = \text{细胞}_{\text{最终}} \times \text{体积}_{\text{最终}}$

2. 如图 1 所示，每孔接种 80 μL 细胞悬浮液（细胞/孔）。无需在背景校正孔（A1、A12、H1、H12）中接种细胞
3. 仅向背景校正孔中添加培养基（无细胞）

- 向每个凹槽孔（共 4 个）中添加 1.0 mL 细胞培养级水。将 8 通道移液器设置为 250 μ L，一次性移液到两个孔中，可实现这一操作。如图 2 所示，向平行于第 1 列和第 12 列的凹槽孔中移液，填充所有 4 个孔

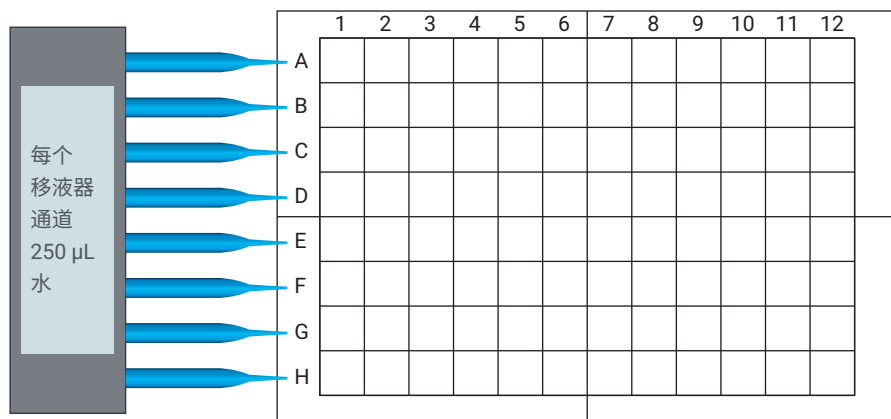


图 2. 使用 8 通道移液管填充凹槽孔

- 重要提示：**在室温下将板在超净工作台中放置一小时
- 放置一小时后，将接种有细胞的微孔板转移至湿度适宜的 37 °C CO₂ 培养箱中。在转移过程中，请勿倾斜或摇晃微孔板，以免凹槽孔中的水洒出
- 让细胞在组织培养箱中过夜生长。使用显微镜监测细胞的生长和健康状况

详细步骤

选择接种密度

最佳细胞接种数量因细胞类型而异，但通常为每孔 0.5 至 4.0×10^4 个细胞，必须根据经验确定。

示例：研究人员想要以 2.0×10^4 个细胞/孔的密度接种 XF Pro M 微孔板，需要获得 4.20×10^6 个细胞/mL 的储备溶液。由于需要接种整个微孔板，因此需要密度为 2.5×10^5 个细胞/mL，总体积为 10 mL 的稀释细胞悬浮液（即 2.0×10^4 个细胞/孔 \div 0.08 mL/孔 = 2.5×10^5 个细胞/mL）。

使用公式 1： $(4.20 \times 10^6 \text{ 个细胞}) \times (X \text{ mL}) = (2.5 \times 10^5 \text{ 个细胞}) \times (10 \text{ mL})$

求解 X，得到 0.595 mL。因此，将 0.595 mL 细胞储备悬浮液添加到 9.405 mL 适当的细胞培养基中，以获得 10 mL 密度为 2.5×10^5 个细胞/mL 的细胞悬浮液，从而在 80 μ L 细胞培养基中提供 2.0×10^4 个细胞/孔的最终细胞密度。

如需了解有关最佳细胞密度的更多信息，请参阅安捷伦 Seahorse XF 分析学习中心，包括相关支持和参考资料：[细胞参考数据库](#)。

收集和重悬细胞

1. 在细胞接种时，单细胞悬浮液非常利于产生一致的细胞单层。在接种前最好分散聚集的细胞。在计数和接种至 XF Pro M 细胞培养微孔板之前确保细胞完全重新悬浮，这一点也很重要。如需了解有关 XF 细胞培养微孔板中细胞培养和接种细胞最佳实践的详细信息，请参阅了解您感兴趣的细胞：[实现成功 XF 分析的建议 \(PDF\)](#)

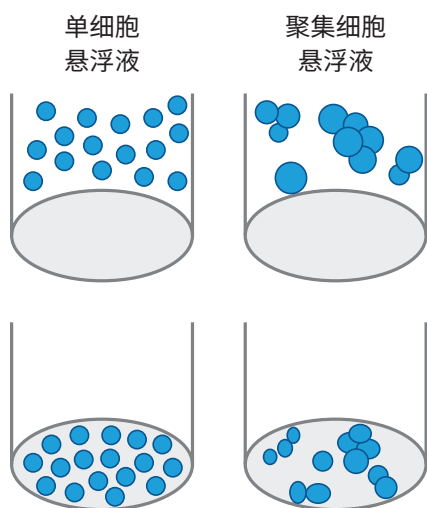


图 3. 单细胞与聚集细胞悬浮液，以及由此得到的孔内细胞分布

表 1. 安捷伦 Seahorse XF Pro M 微孔板细胞接种稀释表

每孔所需细胞密度 (细胞数/80 μ L 培养基)	细胞储备悬浮液 (mL) (1×10^6 个细胞/mL)	生长培养基 (mL)	一块 XF Pro M 微孔板的最小体积 (mL)
0.5×10^4	0.5	7.5	8.0
1.0×10^4	1.0	7.0	8.0
1.5×10^4	1.5	6.5	8.0
2.0×10^4	2.0	6.0	8.0
2.5×10^4	2.5	5.5	8.0
3.0×10^4	3.0	5.0	8.0
4.0×10^4	4.0	4.0	8.0

2. 将细胞稀释至所需的接种密度时，通过移液器将全部溶液混合两到三次，确保悬浮液混合均匀

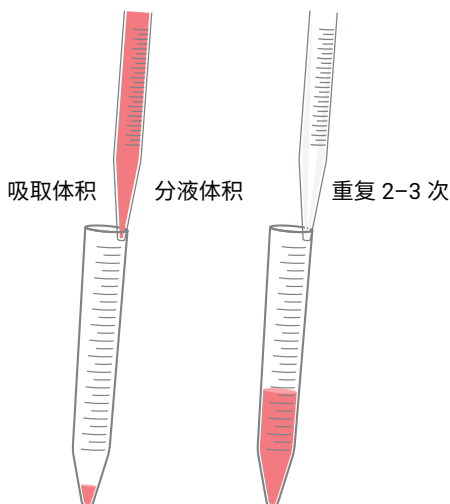


图 4. 充分稀释和混合细胞

3. 将稀释和混合后的细胞转移至移液器储液槽中
4. 混合后，细胞开始在储液槽中沉淀，对于较大的细胞类型尤其如此。因此，建议在接种过程中轻轻混合储液槽中的剩余细胞；通常情况下，接种单个微孔板时，通过移液器进行一到两次额外的混合就足够了。如果使用相同的细胞悬浮液接种多个培养板，则细胞悬浮液也应在接种每块微孔板之间重新混合

将细胞分液至 XF 细胞培养微孔板中

1. 将细胞分液至 XF Pro M 细胞培养微孔板中时，建议使用 8 通道或 12 通道、20–200 μL 移液器，可实现方便、快速的移液，并保持孔间和/或板间的一致性
2. 移液枪头应保持 45 度角左右，大约伸到孔壁的中部，并与孔壁接触（图 5）。对于所有孔，移液器应保持相同的角度
 - A. 在完成细胞分液后，枪头尖端应略微低于培养基液面
 - B. 电子移液器可提高分液体积的一致性

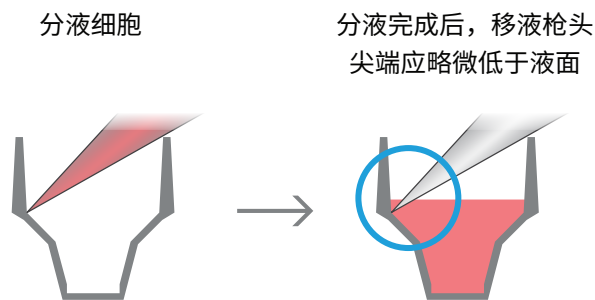


图 5. 将细胞分液至安捷伦 Seahorse XF 组织培养微孔板的正确移液技术

细胞的静置和培养

1. 接种后，在室温下将细胞置于超净工作台中静置一小时。注意，可根据需要将细胞培养板轻轻移动到生物安全柜后部，以便进行静置步骤。在 XF Pro M 细胞培养微孔板中，细胞接种后温度的快速变化可导致显著的边缘生长效应
2. 将细胞置于组织培养箱中
 - A. 培养箱应适当加湿，以防孔内液体过度蒸发。确保组织培养箱水盘中的水达到了建议体积
 - B. 将 XF Pro 细胞培养微孔板靠近培养箱后部放置，尽量减少打开培养箱时温度和湿度的变化
 - C. 如果资源允许，配备一个仅用于培养分析微孔板的培养箱，这样可能有助于减少频繁开关培养箱带来的影响

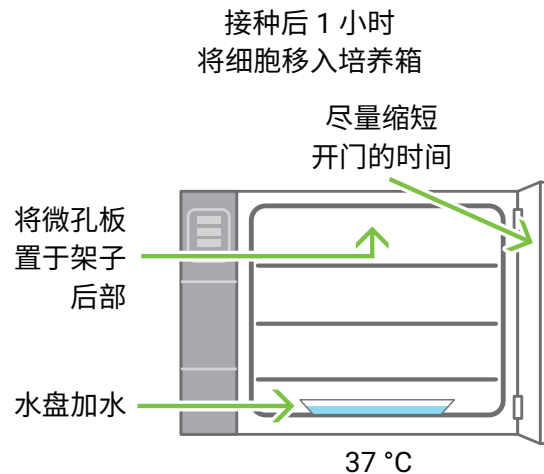


图 6. 将细胞转移至加湿的培养箱中

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。

RA44524.2607175926

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，2021
2021 年 12 月 14 日，中国出版
5994-4356ZHCN

 **Agilent**
Trusted Answers