

Bravo 자동 액체 처리 플랫폼을 이용한 Seahorse XF 분석의 효율성 및 성능 극대화

저자

Lisa Winer
George W. Rogers
Sarah E. Burroughs
Brian P. Dranka
Agilent Technologies, USA

개요

잘 알려진 바와 같이 수동 시료 제조 단계가 데이터 품질, 특히 세포 기반 분석의 데이터 품질에 영향을 미칠 수 있습니다. 수동 시료 제조(피펫팅 포함)는 오류를 일으킬 수 있으며, 상당한 시간이 소모됩니다. 잠재적 오류를 방지하고 수동 제조 시간을 감소시키기 위해, Agilent Seahorse XF 분석 시료 제조는 자동 액체 처리를 사용할 수 있습니다. 일반 분석 워크플로에서의 Agilent Bravo 자동 액체 처리 플랫폼(Bravo)은 다음과 같은 이점을 자랑합니다. 1) 수동 오류로 인한 가변성 감소 2) Microplate 내 및 Microplate 간의 일관성과 재현성 향상 3) XF 분석 준비의 수작업 시간 단축. 전반적으로 Seahorse XF 분석의 자동 액체 처리 단계는 시료 제조 워크플로의 효율성 및 결과 데이터의 일관성을 향상시킬 수 있으며, 이는 특히 일반 화합물 평가 및 용량-반응 연구와 같은 의약품 개발 응용 분야에서 중요한 역할을 담당하였습니다.

서론

세포 기반 분석에 필요한 여러 액체 처리 단계는 데이터 품질에 영향을 줄 수 있습니다. 시료 제조 일관성의 부족은 well, 플레이트 및 반복 분석에 대해 허용할 수 없는 가변성을 야기할 수 있습니다. 이러한 피펫팅 단계는 또한 노동 집약적일 수 있으며, 특히 의약품 개발 프로젝트에서 자주 요구하는 다중 및/또는 대량 반복 분석 수행 시 더욱 그렇습니다.

예를 들어, 설사 숙련된 작업자가 세포 세척을 일관적으로 수행할 수 있다 하더라도, 수동 세포 세척은 여전히 세포 단층을 손상시킬 가능성이 높습니다. 그림 1은 손상을 일으킬 수 있는 일반적인 오류를 보여줍니다. 여기에는 세포 단층을 긁어서 생기는 세포 손상 또는 손실(그림 B), 강한 피펫팅으로 약하게 붙어있던 세포를 이탈시키는 경우(그림 C), 배지를 너무 많이 제거하여 단층 세포를 대기에 노출시켜 손상 또는 분리가 발생하는 경우(그림 D) 등이 포함됩니다. 수동 피펫팅은 또한 세포를 손상시키거나 최종 well 부피에 영향을 줄 수 있는 버블을 유입시킬 가능성이 있습니다.

이와 같은 Seahorse XF 분석 문제를 해결하기 위해, Bravo 자동 액체 처리 플랫폼으로 여러 주요 수동 피펫팅 작업 단계를 자동화할 수 있습니다. 연구자들은 Bravo를 이용하여 액체 처리 단계를 수행하면 데이터 품질 향상과 분석 제조(수작업) 시간을 절약할 수 있습니다. 이는 보다 일관된 데이터를 생성함으로써 XF 분석 과정의 "무인 운영" 시간을 증가하여 생산성을 향상시키는 이점을 제공합니다.

이 응용 자료에서는 XFe96 분석 준비와 관련된 주요한 3개 액체 처리 단계를 자동화하는 분석법에 대해 다룹니다. 이 3개 단계에는 세포 세척, 주입 용액 제조 및 이 용액을 XFe96 센서 카트리지에 로딩하는 과정을 포함합니다. 또한 분석 데이터, "무인 운영" 시간의 예상 수익 등을 포함한 각 자동화 단계를 설명하는 사례도 보여줍니다.

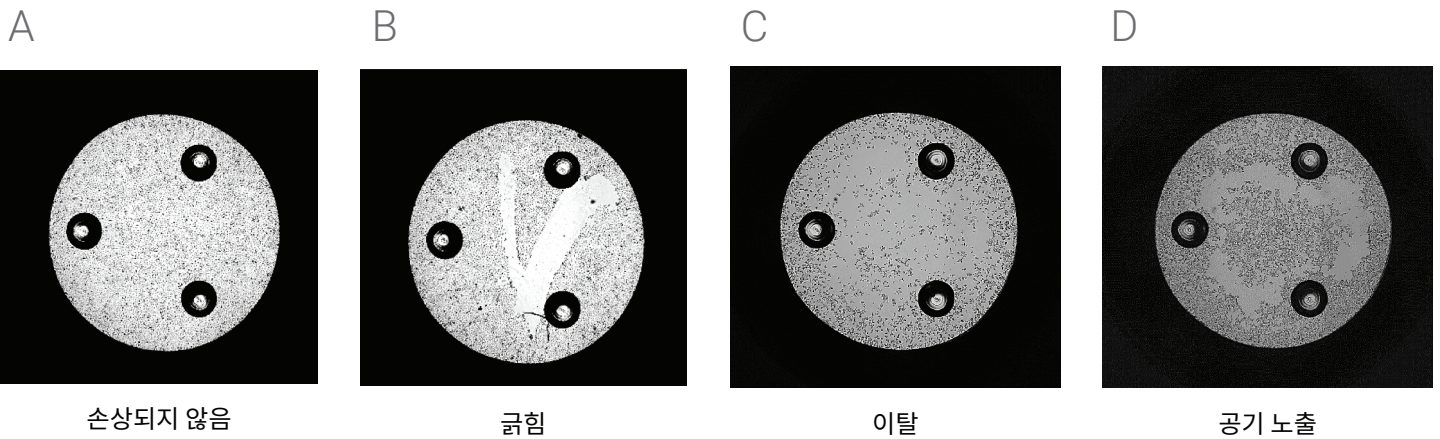


그림 1. XFe96 microplate 내 단일 well의 세포 단층 손상을 보여주는 Bright-field 이미지 A) 손상되지 않은 세포 B) 피펫 팁으로 긁힌 세포 C) 흡입 또는 분배 과정으로 인한 이탈 D) 대기 노출로 인한 분리

재료 및 분석법

세포 배양

HEK293 또는 HepG2 세포를 XF96 세포 배양 microplate에, well당 3.0×10^4 또는 $1.5-2.0 \times 10^4$ 개 세포의 밀도로 시딩하고 37°C 5% CO₂의 조건에서 하룻밤 동안 배양합니다. 10% FBS와 2mM GlutaMAX(Gibco 35050061)로 보충한 DMEM(Gibco 11885084)에서 HEK293 세포를 배양하고, 10% FBS로 보충한 EMEM(ATTC 30-2003)에서 HepG2 세포를 배양하였습니다. 24시간 후, 제조된 세포를 이용하여 XF 분석을 수행하였습니다.

노멀라이제이션 (Normalization)

모든 분석에 마지막으로 20µg/mL(well 내 농도는 2µg/mL)의 Hoescht 핵 염료(Thermo Scientific, PI62249)를 첨가하였으며, BioTek Cytation 1을 이용하여 microplate을 이미지화하였습니다. 각 well 내의 핵을 카운팅하고, 핵의 수치를 이용하여 산소 소모율(OCR)과 세포 외 산성화율(ECAR) 데이터를 노멀라이제이션 하였습니다. Seahorse XF 이미징 및 노멀라이제이션 시스템에 대한 자세한 자료는 Normalization of Agilent Seahorse XF Data by In-situ Cell Counting Using a BioTek Cytation 5를 참조하십시오 <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7908EN.pdf>.

Bravo 설정 및 성능 테스트

모든 분석은 XFe96 분석기와 관련된 소모품을 사용하도록 구성된 Bravo로 수행하였습니다. 이 구성은 Bravo 데크의 4번과 6번 위치에 가열 블록을 갖추고 있습니다. 사전 설정된 흡입 및 분배 속도와 높이를 포함한 각 워크플로 요소의 Bravo 프로토콜(표 S1, 세부사항은 Supplemental Information 참조)은 Bravo Seahorse Assay Workbench 소프트웨어를 통해 수행하였습니다. 표 1은 Bravo용 애질런트 실험기구(저장 용기 및 시약 플레이트)와 XFe96 소모품을 보여줍니다. 모든 XF 분석은 Agilent Seahorse XF DMEM pH 7.4 배지에 10mM glucose, 1mM pyruvate 및 2mM glutamine을 보충한 XF 분석 배지를 사용하여 수행하였습니다. 모든 수동 피펫팅 단계는 XF 분석법 및 지침에서 권장한 대로 수행하였습니다.

애질런트 실험기구 및 소모품	부품 번호	XFe96 분석당 필요한 양		
		세포 세척	화합물 희석	카트리지 로딩
애질런트 24well 저장 용기 (polypropylene, 3.25mL/열, 피라미드 기부 기하 설계 사용)	201296-100	-	-	1
애질런트 96 well 보관/반응 microplate (초고순도 polypropylene, 1mL/square well, 원뿔형 바닥)	201276-100	-	2	-
애질런트 저장 용기 (polypropylene, 86mL, 96 피라미드 기부 기하 설계 사용)	201254-100	2	1	-
애질런트 팁 박스, 250µL, 96-well 랙, Bravo 96LT 헤드와 호환 가능(채워짐)	19477-002	1	2	1
애질런트 팁 박스, 250µL, 96-well 랙, Bravo 96LT 헤드와 호환 가능(비어있는 상태)		-	1	1
Agilent Seahorse XFe96 FluxPak	102416-100	1개 세포 플레이트 (96 Seahorse XF96 세포 플레이트)	1개 XFe96 카트리지, 유틸리티 플레이트 갯수 (96 Seahorse XF96 카트리지, 유틸리티 플레이트 갯수, 384개 포트)	
Seahorse XF DMEM pH 7.4 배지	103575-100	90mL	40mL	20mL
Seahorse XF Glucose(1.0M 용액)	103577-100	0.9mL	0.4mL	0.2mL
Seahorse XF Pyruvate(100mM 용액)	103578-100	0.9mL	0.4mL	0.2mL
Seahorse XF L-Glutamine(200mM 용액)	103579-100	0.9mL	0.4mL	0.2mL
XF 세포 미토콘드리아 스트레스 측정 실험 (oligomycin, FCCP, rotenone/antimycin-A)	103015-100	-	1	1
해당 속도 분석 키트 (2-DG)	103344-100	-	1	1

표 1. 각 자동화 단계에서 필요한 애질런트 실험기구 및 소모품

세포 세척

부착력이 약한 HEK93 세포를 이용하여 세포 단층 손상 또는 세포 손실 없이 세포를 세척하는 Bravo의 기능을 보여줍니다 (그림 1 참조). 그림 2는 세포 세척에 사용된 Bravo 데크 구성 및 실험기구를 보여줍니다. 요약하면, 성장 배지에서 흡입하는 것을 통해 세포를 세척하고 분석 배지에 다시 놓는 과정을 2회 수행하여 최종 well 부피를 180µL로 만들었습니다. Seahorse XFe96 분석기에서 3회 기본 측정을 수행 및 평가하였습니다.

주입 포트 로딩

XF 세포 미토콘드리아 스트레스 측정 실험용 oligomycin, FCCP 및 antimycin-A/rotenone 원액을 수동으로 제조한 후 24열 저장 용기(Agilent, 201296-100)에 분배하였습니다. Bravo를 사용하여 20, 22 또는 25µL의 용액을 각각 XFe96 센서 카트리지의 A, B, C 포트에 옮겼습니다. 그림 3은 XFe96 센서 카트리지를 로딩하는 Bravo 데크 구성을 보여줍니다. 이 일련의 분석을 위한 모든 세포 세척 단계는 Bravo를 사용하여 앞에서 설명한 대로 수행하였습니다.

주입 용액 제조 - FCCP 맞춤형 희석

96-well polypropylene 저장 플레이트(Agilent, 201276-100)에서 희석을 수행하였습니다. 그림 4는 화합물 희석과 XFe96 센서 카트리지를 로딩하는 Bravo 데크 구성을 보여줍니다. 2µM의 희석 간격으로 FCCP의 맞춤형 10단계 희석을 수행하여 최종 농도 범위는 2~20µM이었습니다. 라이브러리 소스 플레이트의 XF 분석 배지 내에 수동으로 100µM의 일반 FCCP 원액을 제조하였습니다. FCCP의 희석은 Bravo를 이용해 100µM 원액으로부터 희석 플레이트에 직접 수행한 후, XFe92 카트리지의 "B" 포트에 자동 로딩하였습니다. 모든 FCCP 처리는 1µM oligomycin이 존재하는 조건에서 수행되었습니다. Bravo를 이용하여 20µL의 10µM oligomycin 주입 용액을 모든 A 포트에 로드하고, 25µL의 rotenone/antimycin A 용액(각 5.0µM)을 모든 C 포트에 로드함으로써 표준 XF 미토콘드리아 스트레스 측정 실험(MST)을 완성하였습니다. 다른 날 이 FCCP 용량 반응 분석을 반복하여 수행하였습니다(2회 반복 분석).

주입 용액 제조 - Antimycin A 연속 희석

XF 분석 배지와 희석된 DMSO내 50mM AA(AA, Sigma A8674-25) 용액으로 100µM의 antimycin A 원액을 제조하였습니다. Bravo 플랫폼을 이용해 애질런트 96 well 저장 플레이트(#201276-100)에서 후속 희석 작업을 수행했습니다. 동일한 microplate에서 8개의 독립적이고 동일한 AA 희석액 시리즈를 동시에 제조하였습니다. 각 희석액 시리즈는 왼쪽부터 오른쪽으로 10단계 2배 연속 희석으로 제조되며, 이로써 주입 포트 농도 범위는 10~0.02µM이었습니다. Bravo를 이용해 AA 희석액을 XFe96 카트리지의 "A" 포트에 로드하였습니다. 3회 독립 분석을 수행하였습니다.

데크 레이아웃

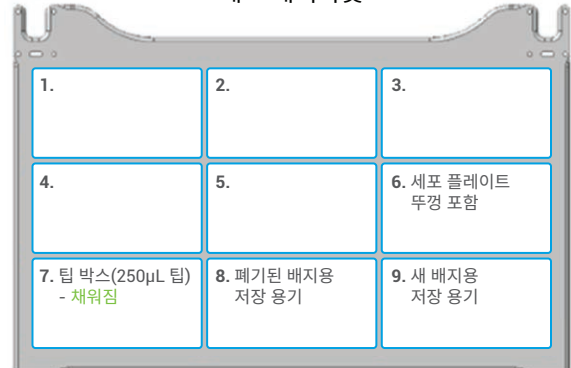


그림 2. 세포 세척에 사용된 Bravo 데크 구성 및 실험기구

데크 레이아웃

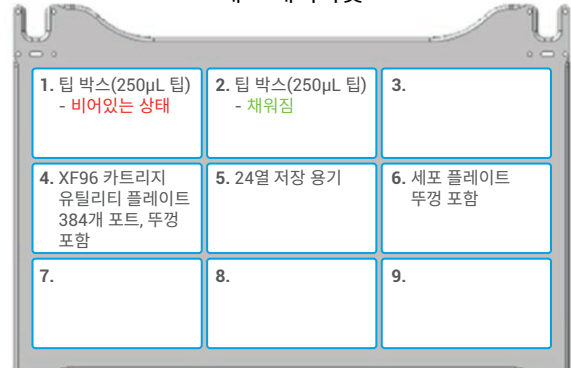


그림 3. 주입 포트 로딩에 사용된 Bravo 데크 설정 및 실험기구

데크 레이아웃

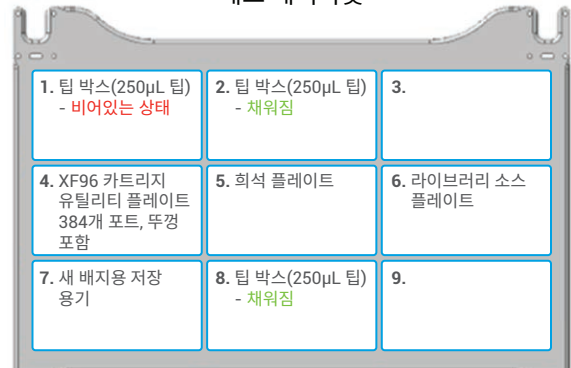


그림 4. 연속 희석에 사용된 Bravo 데크 설정 및 실험기구

화합물 라이브러리에서 미토콘드리아 및 해당작용 억제제 스크리닝

Selleck-Pfizer 라이브러리(Selleckchem.com, 부품 번호 L2400, Pfizer 인증 받은 화합물 라이브러리)의 총 72가지 화합물에 대해 미토콘드리아 및 해당작용 억제제를 스크리닝하였습니다. 이 소규모 스크리닝에서 Bravo를 사용하여 1) 세포 세척, 2) 96 well 소스 플레이트 내의 화합물 라이브러리에 대한 100배 희석 수행, 3) 20µL의 희석된 화합물을 XF96 센서 카트리지 포트 A로 분배하였습니다. Seahorse XFe96 분석은 3회의 속도 측정(기본 OCR과 ECAR), 그 후의 실험 대상 화합물(최종 농도 10µM) 주입과 9회의 추가 속도 측정으로 구성되었습니다. 최종으로 얻은 OCR과 ECAR의 값(12번)은 억제 활성 측정에 사용되었습니다.

3회 XF 분석을 동시에 수행하여 기술 반복 microplate를 생성하였습니다. 이 분석법을 3회 반복 수행하여 총 9개 기술 반복을 얻었습니다(즉, 9개 개별 microplate). OCR 억제 양성 대조로 0.5µM antimycin A/rotenone cocktail(AA/Rtn)을 사용하고, ECAR 억제 양성 대조로 50mM 2-deoxyglucose (2-DG)를 사용하며, 캐리어 대조로 0.1% DMSO(최종 농도)를 사용해 데이터 품질의 Z'를 생성하였습니다.

결과 및 토의

Hoescht 핵 염료(Thermo Scientific, PI62249) Seahorse XF 분석은 특정 응용 또는 사용된 키트와 관계없이 공동의 시료 제조 요소를 가집니다.

- XF96 세포 배양 microplate 내에 세포 시딩
- 세포 세척(배양 배지를 분석 배지로 교체)
- 화합물 제조(희석)
- 화합물 포트를 XF96 센서 카트리지로 로딩

이러한 일반 워크플로 단계에는 대량의 피펫팅 작업이 포함되며, 분석에 오류를 야기할 가능성이 있기 때문에 자동화가 필요합니다.

이 프로젝트는 Bravo 자동화 기술이 Seahorse XFe96 분석에 생세포 배양 후의 시료 제조에 대한 유용성을 평가하기 위해 b-d 단계에 중점을 두었습니다. 예전의 연구에서 Bravo를 이용한 자동 세포 시딩은 분석 견고성을 향상시킬 수 있다는 것을 증명하였습니다([Gestin et al.](#)). Bravo를 조직 배양 후에도 설치할 수 있으나, 본 실험실에서는 Bravo를 조직 배양 후에도 설치하지 않았기 때문에 자동 세포 시딩 성능을 평가하지 않았습니다.

그림 5는 Seahorse XF 분석의 전체 워크플로를 보여줍니다.



그림 5. 일반적인 Seahorse XF 분석 워크플로. 세포 세척, 주입 용액 제조, Seahorse XFe96 센서 카트리지 로딩 등 Bravo를 이용한 자동 시료 제조 단계는 녹색으로 표시됨. 플레이트당 총 수작업 시간을 20~60분 절감

세포 세척

부착 세포를 이용한 XF 분석을 수행하기 전에, 세포를 세척하고 배양 배지 구성을 제거하여 세포 XF 분석 배지로 교환해야 합니다. 자동화 시스템은 세포 손상이나 손실 없이 일관되게 세포를 세척할 수 있다는 것을 확인하기 위해, 부착력이 약한 HEK293 세포를 이용하여 테스트하였습니다. 세포 세척 시, 너무 빠르게 배지를 분배 및/또는 피펫 팁이 세포 단층과 부딪히게 되면 부착력이 약한 세포는 이탈할 수 있습니다. 세포 층과 접촉하는 것을 방지하기 위해, Bravo는 well 바닥까지의 높이를 프로그래밍 가능합니다. 또한 분석 배지의 흡입 및 분배 속도도 프로그래밍 가능하므로, 세포가 XF96 세포 배양 microplate로부터 이탈하는 위험을 최소화할 수 있습니다.

자동 세포 세척을 평가하기 위해, HEK293 세포를 이용하여 XF 분석을 수행하고 기초 호흡량(산소 소모율, OCR) 및 산(H+) 생성(세포의 산성율, ECAR)을 측정하였습니다(그림 6). 표시된 데이터는 Bravo가 세포 세척 단계를 일관적으로 수행할 수 있음을 보여줍니다. 제시된 사례에서, Bravo를 사용한 세척 후 얻은 well 간의 노멀라이제이션 속도는 큰 차이를 보이지 않았습니다(그림 6B). 또한 3일 반복 분석한 결과, 일별 데이터는 일관된 ECAR 값을 나타나고 표준 오류도 매우 낮습니다. 이 데이터는 Bravo를 사용한 세포 세척은 세포 단층의 완전성을 잘 유지하였다는 점을 의미합니다(그림 6C). 또한 세포를 세척하기 전에, Bravo는 Cel-Tak을 갖춘 XF96 세포 배양 microplate에서 부착된 서스펜션 세포를 성공적으로 세척하였습니다(데이터 표시하지 않음).

Bravo는 well 내의 팁 높이와 액체 흡입 또는 분배 속도를 제어함으로써 세포 단층의 손상 위험을 최소화할 수 있습니다(그림 1에 설명됨). 이는 well 내의 잔여 부피 일관성을 개선할 수 있으며, 세포가 well 표면으로부터 긁혀지거나 이탈되는 것을 방지하고, 기포 형성을 방지해줍니다. 또한 세포 세척 과정 내내 배지와 세포 플레이트를 Bravo 데크 위에 놓고 37°C로 유지합니다. 이는 세포와 분석 배지의 온도 변화를 최소화함으로써, 분석 결과 차이를 더욱 감소시켰습니다.

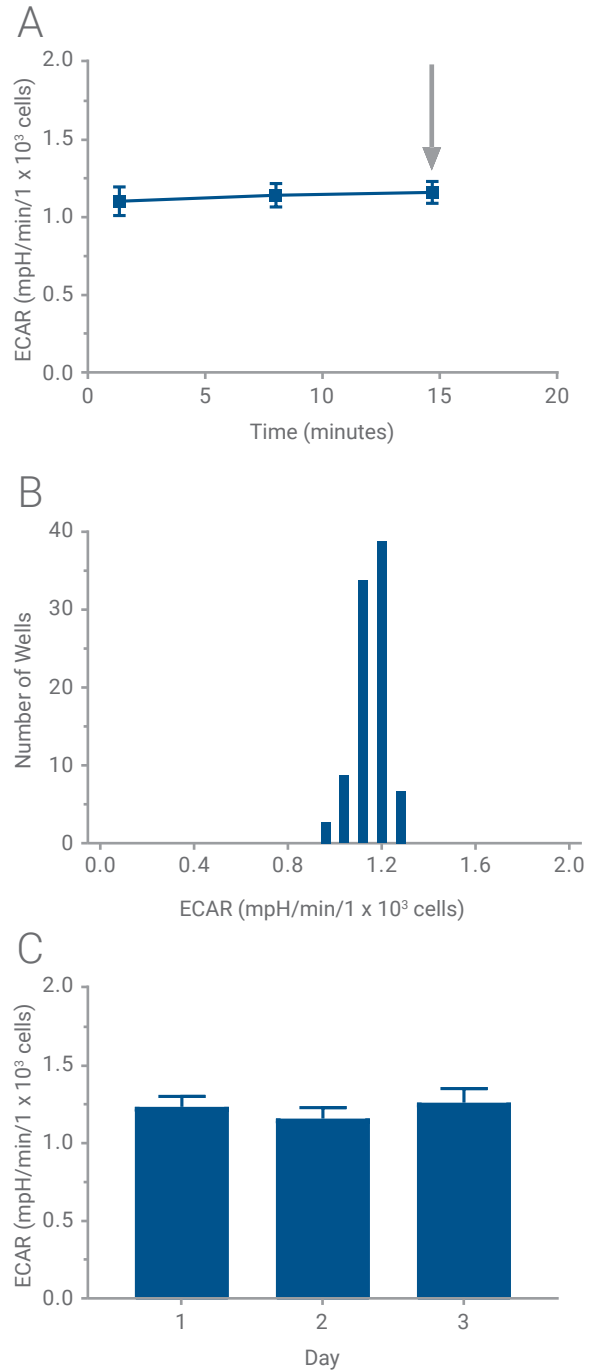


그림 6. 자동 세포 세척 프로토콜 테스트. HEK293 세포를 microplate에 시딩하고 Bravo를 이용해 자동 세포 세척을 수행한 후, Seahorse XF 분석 수행. 3번째 속도 측정치를 이용하여 데이터 비교 수행. A) 노멀라이제이션의 기본 ECAR(주입 없음) XF 분석. 화살표는 그림 B와 C에 사용된 데이터를 표시함. B) 단일 XF96 microplate(n=92well) ECAR 값의 막대 그래프(측정 3). C) 3일간 수행한 3회 반복 분석의 ECAR 값(측정 3). 데이터는 평균 +/- STDEV (n = 92)로 표시

주입 포트 로딩

Seahorse XF 분석 수행 전, 일반적으로 센서 카트리지에 1개 또는 그 이상의 주입 포트에 로드해야 합니다. 주입 용액의 정확도와 정밀도를 보장하고 각 well에 동일한 약물 농도를 보장하기 위해 주어진 일련의 주입 포트(예를 들어 모든 "A" 주입 포트)에 로드된 주입 용액의 부피는 동일해야 합니다. 또한 액체가 주입 포트 바닥으로 누출되지 않도록 포트를 조심스럽게 로드해야 합니다.

주입 용액이 정확하고 일관되게 Bravo에 로드되었다는 것을 검증하기 위해, 3회의 순차 주입으로 구성된 XF 세포 미토콘드리아 스트레스 측정 실험(MST)을 수행하였습니다. FCCP 농도의 작은 변화에도 매우 민감한 최대 호흡(그림 7A 화살표) 파라미터를 분석하였습니다.

그림 7은 주입 용액을 센서 카트리지 포트에 로드할 때, Bravo의 정확하고 일관된 성능 수행을 보여줍니다. 각 well에 대한 분석을 근거하여, FCCP 농도의 작은 변화에도 매우 민감한 지표인 최대 반응은 거의 동일한 호흡을 및 MST 주입에 대한 반응(그림 7B)을 나타냈습니다. 마지막으로, 다른 날 이 분석을 반복 수행한 결과, 일별 데이터는 일관된 OCR 값을 나타내고 표준 오류도 매우 낮습니다(그림 7C). 위에서 서술한 바를 종합하면, Bravo는 일관되게 주입 용액을 지정된 포트까지 옮길 수 있으며, 어떤 의미에서는 각 포트별 완벽한 주입을 지원함을 보여준다.

정확하고 일관된 포트 로드는 고품질 데이터를 획득하는 데에 필수적입니다. 숙련된 수동 작업자는 정확하고 일관성 있게 포트에 로드할 수 있지만, 여전히 오류를 발생할 가능성이 있으며 수동 기술은 사람에 따라 큰 차이를 보입니다. 정확하지 않게 포트에 로드하면, 주입 실패를 초래하거나 화합물이 주입 전 포트에서 누출될 수 있습니다. 부분 주입 또는 올바르게 옮기지 않는 부피로 인해 well 내의 농도가 예상치보다 낮아질 수 있습니다. 분석 과정 중 누출이 발생하면, 예상한 것보다 빠른 반응을 초래할 수 있으며, 이러한 데이터는 종종 분석에 적합하지 않습니다. Bravo는 기포 없고 과도한 압력의 사용 없이 정확한 부피를 분배함으로써, 모든 XF 분석을 위해 일관되게 이 단계를 수행할 수 있습니다. 또한 피펫 팁 및/또는 포트의 교차 오염과 같은 사용자 오류의 위험성을 더욱 감소시킵니다.

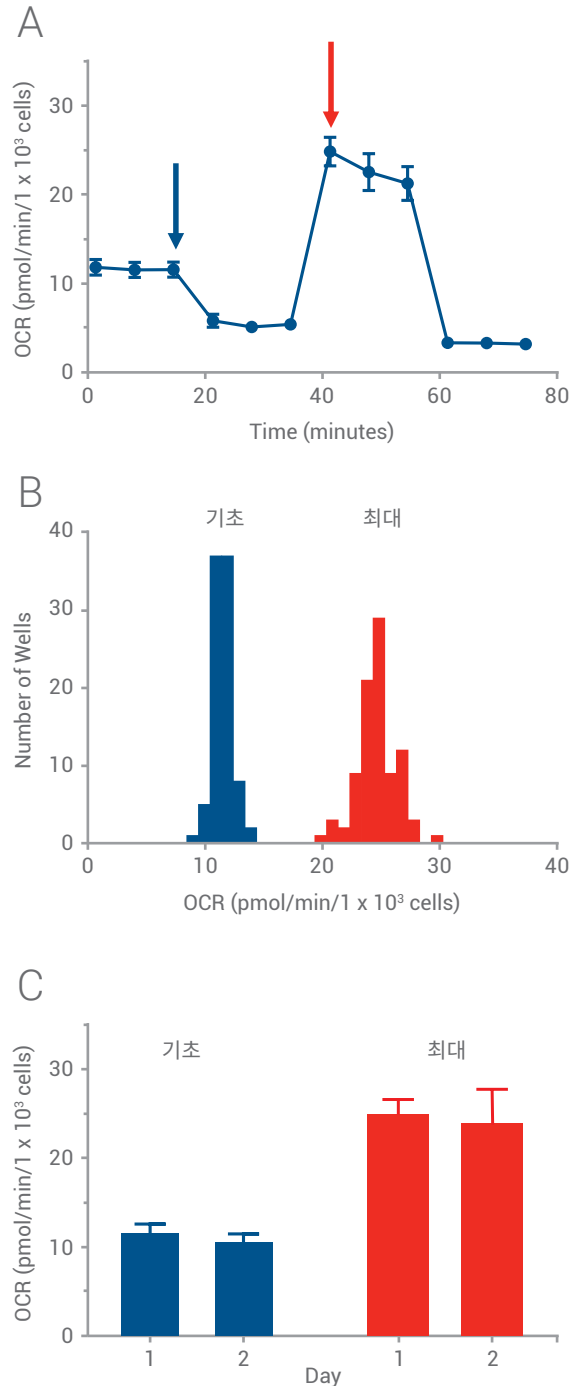


그림 7. 자동 주입 포트 로딩 평가. HepG2 세포를 XF96 세포 배양 microplate에 시딩하고 24시간 동안 배양한 후 분석 수행. Oligomycin, FCCP 및 rotenone/antimycin A의 MST 주입 용액을 제조 및 XF 카트리지에 로드. A) 세포 미토콘드리아 스트레스 측정 실험 결과, 화살표는 그림 B와 C에 사용된 기초(푸른색) 및 최대(빨간색) 호흡 데이터 표시. B) 단일 XF96 microplate(n=92 well)의 노멀라이제이션된 기초 및 최대 OCR 값(측정 3과 7)의 막대 그래프. C) 2회 독립적인 분석의 평균 노멀라이제이션된 기초 및 최대 OCR 값(측정 3과 7). 데이터는 평균 +/- STDEV (n = 92)로 표시

연속 희석 및 용량-반응 분석

일련의 화합물 또는 약물 후보 특성 규명 시, 일반적으로 효능을 평가하기 위해 용량-반응 분석을 수행해야 합니다(예: IC₅₀ 또는 EC₅₀). Bravo는 복잡한 희석 매트릭스 분석 준비 및 수행의 수작업 요건(과 관련 위험성)을 최소화함으로써 이 절차를 용이하게 합니다.

1) 단일 microplate 내의 기술 반복(그림 8과 9) 2) 여러 microplate 간의 기술 반복(그림 10과 11), 이 2가지 분석 설계를 이용하여 Bravo의 용량-반응 매트릭스 생성 성능을 측정하였습니다.

이상 서술한 바와 같이, 세포 호흡율은 특히 최대 농도에서 FCCP 농도의 작은 변화에 매우 민감합니다. 따라서 보다 좁은 FCCP 농도 범위 내의 용량-반응 분석은 용량-반응 분석 제조에서의 Bravo 정밀도를 견고하게 측정할 수 있습니다.

단일 플레이트 내의 기술 반복을 테스트하기 위해(그림 8), MST 분석을 통해 HepG2 호흡의 0.0~2.0µM(증가율 0.2µM) FCCP에 대한 반응을 측정하였습니다. 최대 호흡(그림 9A 화살표)은 이 좁은 범위 내에서 선형으로 증가하여, 1µM FCCP에서 최대 OCR에 달성한 후 2µM FCCP에서 약간 하락됩니다(그림 9B). 각 농도는 낮은 CV에서 서로 다른 반응을 획득하며, 이는 Bravo가 맞춤형 연속 희석을 준비할 때 정밀도가 우수함을 나타냅니다. 며칠(N=2)에 걸쳐 분석 수행 시, 결과 데이터는 FCCP에 대한 일관성 있는 반응을 나타내고 모든 용량의 CV는 10% 미만입니다(그림 9B C).

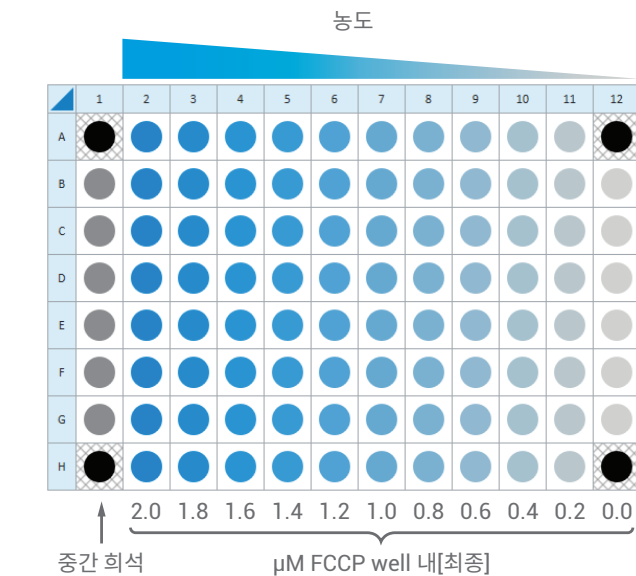
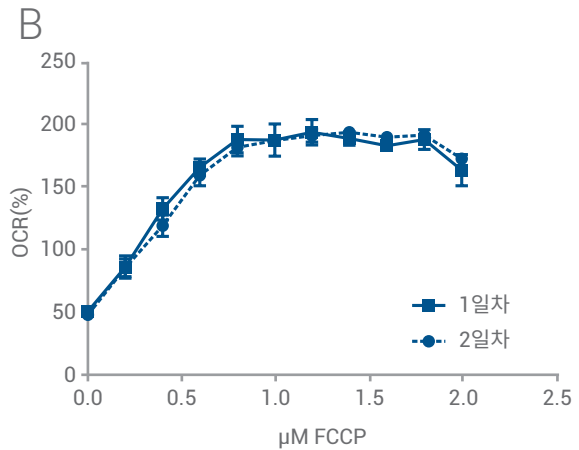
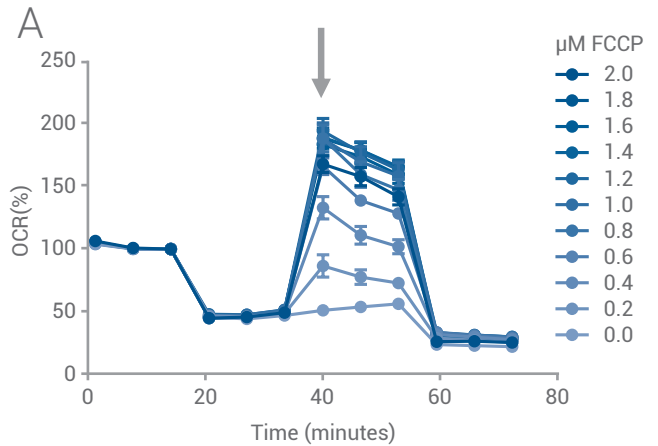


그림 8. 단일 microplate 내의 기술 반복 테스트용 플레이트 레이아웃. 단일 화합물 (FCCP)을 사용하여 XF 용량-반응 분석을 설계. 분석은 10단계 희석으로 구성되고 FCCP 최종 농도 0.0~2.0µM, 농도당 8개 기술 반복 있음



C

1일차			µM FCCP	2일차		
%OCR	STDEV	%CV		%OCR	STDEV	%CV
51.0	2.1	4.2	0.0	48.2	1.8	3.8
86.7	9.1	10.5	0.2	86.0	7.1	8.2
133.3	9.1	6.8	0.4	119.7	8.6	7.2
166.5	6.7	4.0	0.6	160.0	8.4	5.3
188.9	10.6	5.6	0.8	182.5	7.0	3.9
188.4	13.0	6.9	1.0	187.9	3.8	2.0
194.7	10.3	5.3	1.2	192.0	5.3	2.7
189.8	5.4	2.9	1.4	194.7	1.9	1.0
183.9	4.6	2.5	1.6	190.6	3.2	1.7
188.9	7.9	4.2	1.8	192.5	4.2	2.2
164.3	12.6	7.6	2.0	173.5	5.0	2.9

그림 9. Microplate 내의 기술 반복. 보다 좁은 FCCP 적정 범위에서(증가율 0.2µM, 0~2µM) HepG2 세포에 미친 영향 분석. Bravo를 사용해 FCCP 주입 용액을 제조하고 카트리지에 로드. A. FCCP 적정 및 상대 OCR 반응의 역학적 그래프. B. 2회 독립적으로 수행된 실험을 보여주는 FCCP 적정의 용량-반응 곡선, N=8(데이터 곡선당 8행x1개 플레이트). C. 테스트된 모든 농도의 %OCR, STDEV 및 %CV의 일별 비교 값

여러 microplate 간에 기술 반복 분석으로 얻은 효능 측정 결과의 일관성도 평가하였습니다. Bravo를 이용하여 AA에 대해 10단계의 2배 연속 희석을 수행하였으며(그림 10A), 이를 XF96 센서 카트리지 포트 "A"로 로드하였습니다. 각 연속 희석은 독립적으로 수행되었습니다. 즉 Bravo의 서로 다른 8개 팁을 사용하여 8개 AA stock well을 동시에 희석하였으며, 독립적인 희석액 시리즈 AA1~AA8을 생성하였습니다.

XF 분석 수행: 3개 기초 측정치를 기록하고 AA를 주입한 후에 3개 속도 측정치를 기록합니다(그림 10B). 측정 7 및 측정 3(100%로 정의)의 속도비를 이용하여 반응을 계산하였으며, %OCR 대 μM AA의 도표를 작성하여 각 희석액 시리즈의 IC_{50} 값을 생성하였습니다(그림 10C). 결과는 Bravo로 제조한 각 AA 희석액 시리즈의 반응이 일관적이라는 것을 보여주고, 플레이트/일별로 매우 가까운 평균 IC_{50} 값이 나타났습니다.

전반적으로 모델 용량-반응 분석 데이터는 Bravo 플랫폼이 화합물에 대해 복잡한 연속 희석 수행 시 높은 재현성을 나타냅니다. 이 재현성은 단일 반복 플레이트가 신뢰성 있는 반응을 제공할 가능성을 높이고, 여러 반복 microplate의 용량-반응 분석 데이터를 조합할 수 있도록 합니다. 이상 서술한 바와 같이, 수동 희석은 이전 시 작은 부피 차이(희석 단계를 통해 확대됨)의 위험성을 증가시킬 수 있고, 화합물 교차 오염의 발생 확률도 높일 수 있습니다. Bravo는 시료 교차 오염 없이, 적은 양을 정확하고 정밀하게 이전할 수 있습니다. 마지막으로 Bravo는 여러 단계를 포함한 수작업 대신 단일 자동화 단계로 XF 카트리지 포트에 로드하여, 관련 변이성 또는 오류 발생의 가능성을 더욱 낮춥니다.

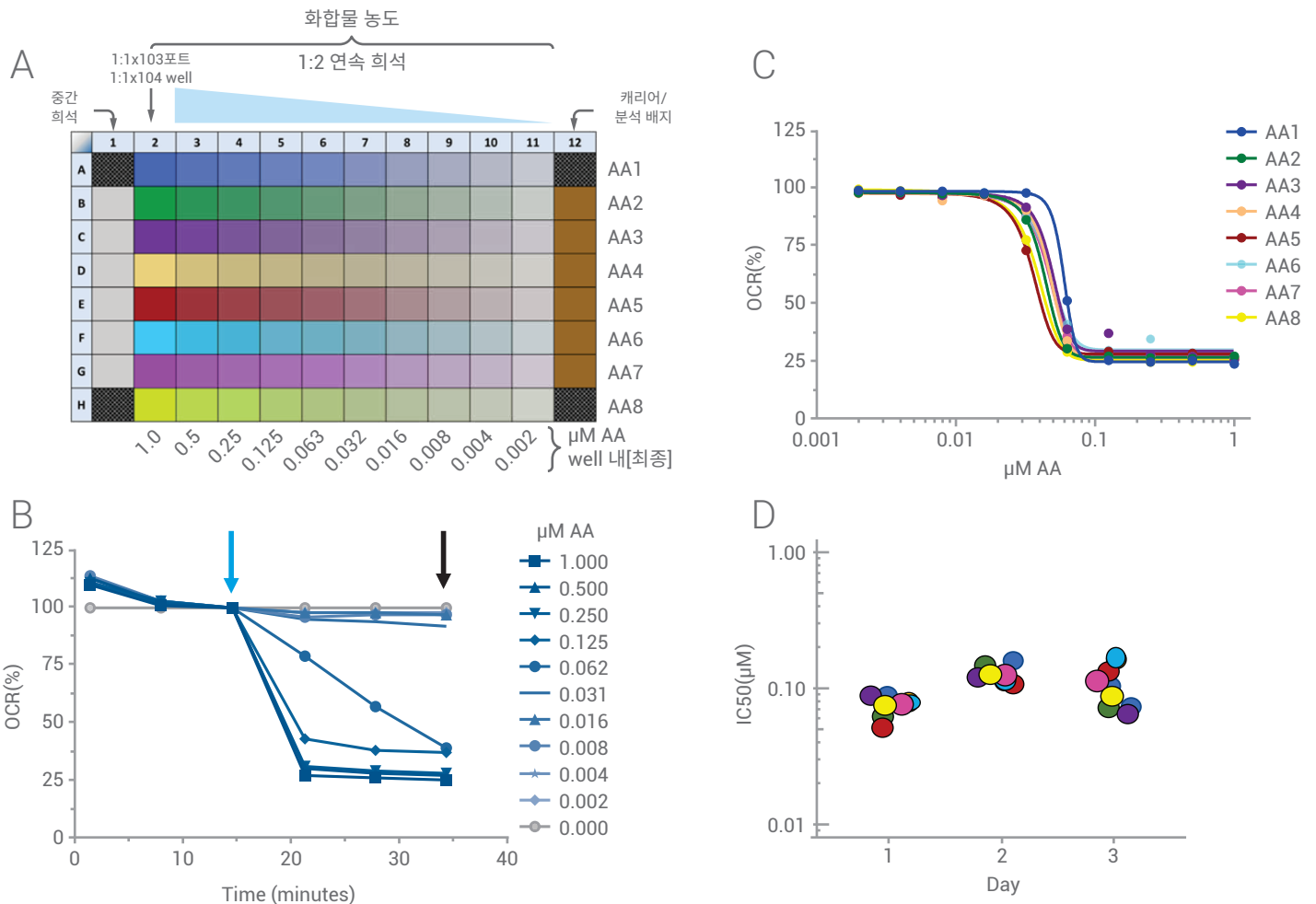


그림 10. 화합물 용량 반응 분석 A. 8개의 개별로 제조된 AA 희석액 시리즈 용액이 AA1, AA2...AA8로 라벨링됨. 각 용액을 10단계 2배 연속 희석하여 최종 AA 농도 0.002~1.0 μM . 최종 농도를 플레이트 바닥에 표시. B. 단일 희석 시리즈(AA1)의 XF 역학적 데이터. C. 단일 플레이트의 용량-반응 곡선(AA1~AA8). D. Antimycin-A 적정 성능. 그림 A의 각 분석 레이아웃에 근거하여 행별 IC_{50} 값 계산. 각 점은 단일 희석 시리즈(플레이트 행)에서 계산된 IC_{50} 값 표시. 매 행과 매일의 값이 일관성 있음

화합물 라이브러리 스크리닝 - 급성 억제 분석

완전 자동화된 워크플로를 입증하기 위해 소형 화합물 라이브러리에서 미토콘드리아 및 해당작용 억제제를 스크리닝하였습니다. Selleck-Pfizer L2400 라이브러리의 72가지 화합물(그림 11 위)에 대해 미토콘드리아 및 해당작용 억제 활성을 스크리닝하였습니다. Bravo는 테스트 대상 화합물을 최종 well 내의 농도가 10µM될 때까지 희석한 후, 테스트 화합물과 대조 화합물을 주입 포트에 로드했습니다.

위에서 언급된 바와 같이 Seahorse XFe96 분석기로 HepG2의 기초 속도를 측정하였으며, 라이브러리 화합물을 주입해 1시간 내의 급성 OCR 및 ECAR 반응을 기록하였습니다(그림 11 아래). 80분에서의 속도(파란색 화살표) 및 화합물 주입 전의 속도(주황색 화살표)의 비로 반응을 계산하고, 화합물 주입 전 속도의 %로 표시합니다. 이 분석을 하루에 3회씩 총 3일간 반복 수행하여 도합 9개의 반복 스크리닝 플레이트를 생성하였습니다.

Z'는 분석 성능의 표준 측정 지표이므로, 각 반복 플레이트의 주요 산출 데이터에 대해 모두 계산되었습니다(그림 12). AA/Rtn 화합물 각테일을 양성 대조로 사용하여 미토콘드리아 억제 효과를 분석하였습니다. 2-deoxyglucose(2-DG)를 양성 대조로 사용하여 해당작용 억제 효과를 분석하였습니다. 미토콘드리아 억제 분석의 평균 Z' 값은 0.88이고 해당작용 억제 분석의 평균 Z' 값은 0.77이며, 이는 견고한 분석 설계와 수행 과정을 의미합니다.

화합물 라이브러리에 대해 상대적 OCR(%) 또는 ECAR(%)을 이용하여 반응을 도표를 작성하였습니다(그림 13). 각 화합물의 반응 SD를 나타내는 낮은 오류 막대는 억제 분석의 플레이트간 및 일간 재현성이 높다는 것을 의미합니다. 이 재현성과 Z' 데이터는 Bravo 자동 액체 처리 및 Seahorse XFe96 플랫폼이 미토콘드리아 및 해당작용 억제제를 검출하는 견고한 분석법이라는 것을 보여줍니다.

그림 11에 보여준 분석 설계에서 화합물 주입 전과 주입 후 1시간에 동일 well 내의 세포를 분석하였습니다. 이 플랫폼은 또한 XF 분석 전의 실험 설계 및 성능을 지원합니다. 그 중에서 화합물을 이용하여 세포를 처리함으로써(만성 노출) 장기적인 화합물 처리 역학적 효과를 성취합니다. 이러한 경우, XF 분석 수행 전 Bravo는 사전 설정된 시간(예를 들어 24시간 전)에 관심 세포를 포함한 XF 세포 배양 microplate에 화합물을 직접 분배합니다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	AM	2-DG	BKG
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	AM	2-DG	BKG
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	AM	2-DG	세포 플랫폼
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	AM	2-DG	세포 플랫폼
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	VEH	AA/Rtn	세포 플랫폼
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	VEH	AA/Rtn	세포 플랫폼
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	VEH	AA/Rtn	BKG
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	VEH	AA/Rtn	BKG

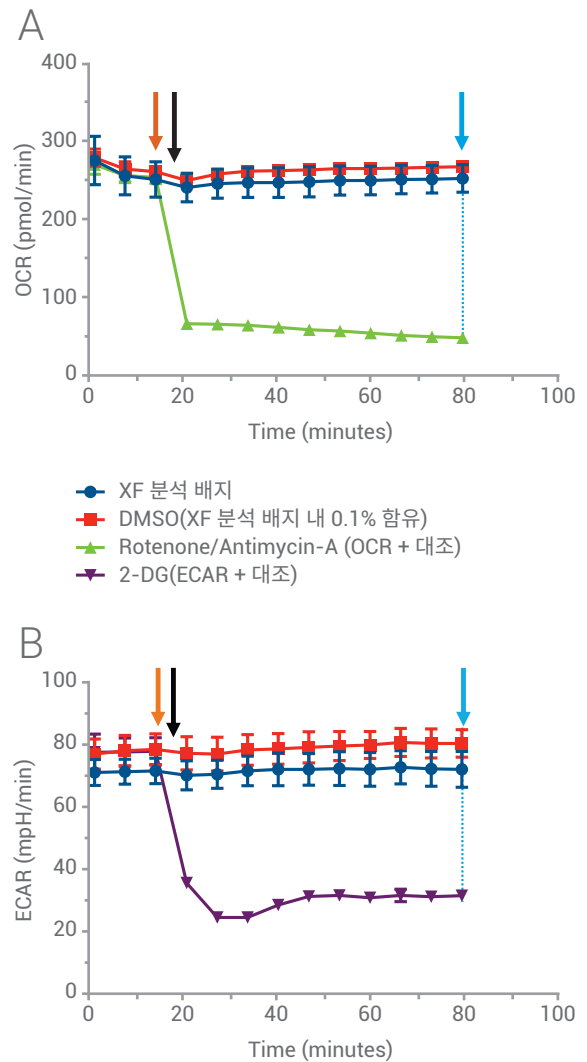


그림 11. 화합물 라이브러리 스크리닝. 위. XFe96 플레이트 맵. 화합물을 번호(1~72)로 라벨링함. AM: 분석 배지; VEH: DMSO 대조; 2-DG: ECAR 양성 대조; Rtn/AA: OCR 양성 대조. 아래. XF 분석의 OCR(A) 및 ECAR(B), 주입 시간은 검은 화살표로 표시. % 반응 계산에 사용된 데이터 포인트는 각각 주황색 화살표(100%)와 파란색 화살표로 표시

일-플레이트	OCR Z'	ECAR Z'
1-A	0.92	0.84
2-A	0.87	0.72
3-A	0.83	0.29
1-B	0.89	0.87
2-B	0.88	0.86
3-B	0.88	0.84
1-C	0.88	0.84
2-C	0.86	0.77
3-C	0.90	0.88
AVERAGE Z'	0.88	0.77

요약

이 응용 자료는 XF 분석 시료 제조용 자동 액체 처리의 분석법 및 성능에 대해 설명합니다. Bravo 플랫폼을 사용하여 세포 세척, 주입 용액 제조 및 센서 카트리지를 포트 로딩 단계를 자동함으로써 정확하고 일관성 있는 결과를 제공할 수 있습니다. Bravo 플랫폼은 또한 다음과 같은 이점을 제공합니다. 1) 반복 수동 피펫팅 작업과 관련된 수동 오류 감소. 2) microplate 내부 및 microplate 간의 데이터 품질 신뢰성과 일관성 향상. 3) XF 분석 준비의 "수작업" 시간 감소. 이는 XF 분석의 주요 수동 액체 처리 단계를 자동함으로써 XF 분석 워크플로의 효율성을 향상시키고 데이터 품질을 개선할 수 있습니다.

그림 12. 반복 급성 억제 분석의 Z' 값. 하루에 3회 분석하여 총 3일간 반복 수행으로 얻은 OCR 억제 대조(rotenone/AA) 및 ECAR 억제 대조(2-DG)의 Z' 값(화합물당 n=9)

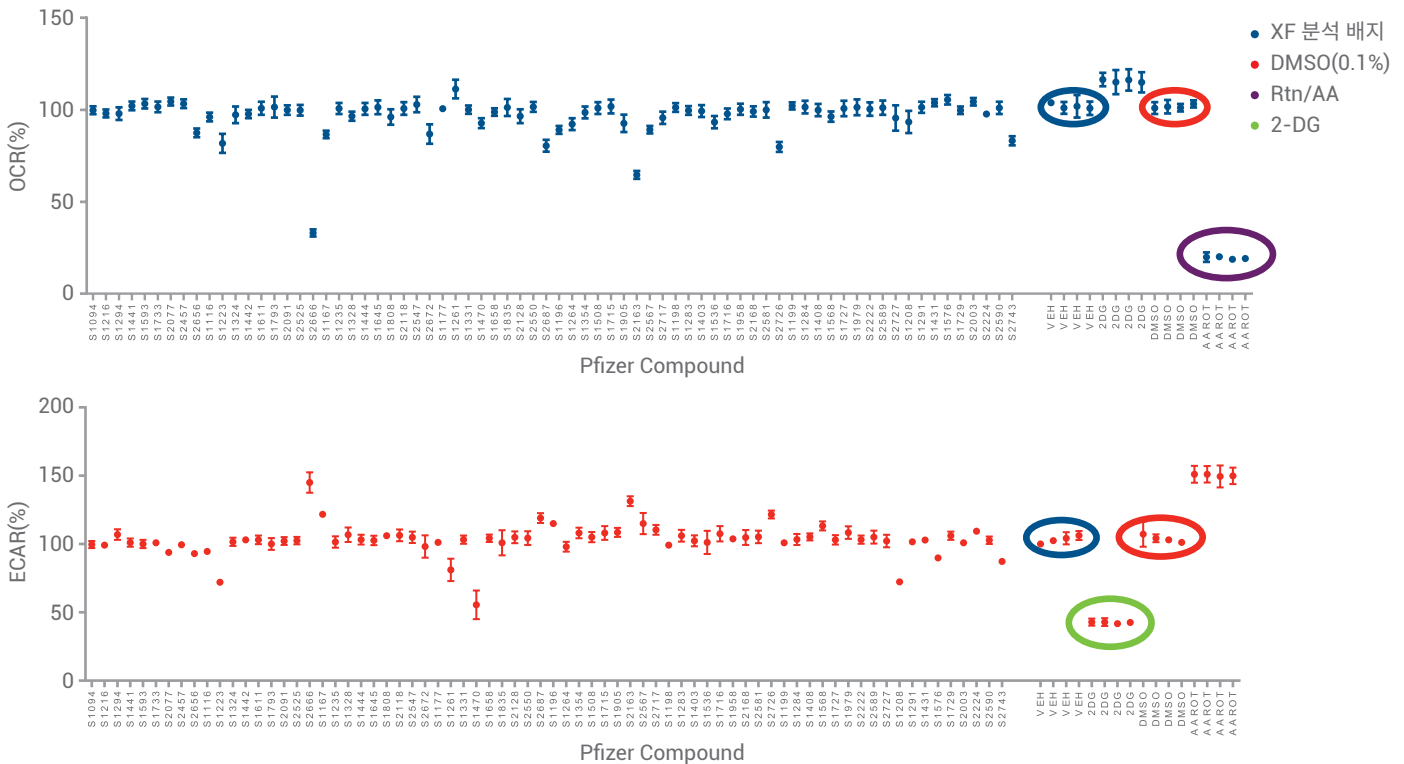


그림 13. Selleck-Pfizer L2400 라이브러리의 화합물 라이브러리를 이용한 급성 억제 분석 사례의 결과. 위 그림은 미토콘드리아 활성에 대한 반응(%OCR), 아래 그림은 해당작용 활성에 대한 반응(%ECAR). 또한 양성 대조 화합물 rotenone/antimycin-A(OCR 억제제, 보라색) 및 2-DG(ECAR 억제제, 녹색)의 반응을 표시. 캐리어 대조(0.1% DMSO)의 OCR과 ECAR 반응은 빨간색 원으로 표시

보충자료

XFe96 및 XF96 분석기와 Agilent Bravo 자동 액체 처리 플랫폼을 결합하여 사용하는 사양 요구(모든 높이는 지정된 플레이트의 바닥 또는 표면에서부터 측정)

세포 플레이트 내의 흡입 높이	3mm
흡입 속도:	
XF96 세포 플레이트	"고정 팁 51~200µL"
저장 용기(86mL)	기본값
저장 플레이트(96)	기본값
24열 저장 용기	기본값
분배 높이:	
저장 용기(86mL)	2mm
XF96 카트리지	0.5mm
분배 속도:	
XF96 세포 플레이트	"고정 팁 느린 세척"
저장 용기(86mL)	기본값
XF96 카트리지	"384 1회용 팁 10~50µL"

표 S1. Agilent Seahorse XFe96 분석기와 Agilent Bravo 자동 액체 처리 플랫폼을 결합하여 사용하는 사양 요구

www.agilent.com/chem/discoverxf

연구 용도로만 사용하십시오.
진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 3월 4일, 한국에서 인쇄
5994-0717KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr