

使用 Bravo 自动化液体处理平台最大限度提高 Seahorse XF 分析的效率和性能

作者

Lisa Winer
George W. Rogers
Sarah E. Burroughs
Brian P. Dranka
安捷伦科技公司，美国

摘要

众所周知，手动样品前处理步骤会影响分析数据的质量，尤其对于细胞相关实验。手动样品前处理（包括移液）可能会引入误差，并且会耗费大量时间。为了避免潜在的误差，减少手动操作时间，建议使用自动化液体处理系统进行安捷伦 Seahorse XF 分析的样品前处理。在常规分析工作流程中，Agilent Bravo 自动化液体处理平台 (Bravo) 的优势如下：1) 减少手动操作引起的误差，2) 提高微孔板内和微孔板间的一致性和重现性，3) 减少 XF 分析前处理的手动操作时间。总的来说，利用自动化液体处理平台进行 Seahorse XF 分析，能提高样品前处理工作流程的效率和结果数据的一致性，特别是在常规的化合物评估和剂量响应研究等药物发现应用中。

前言

细胞相关分析通常涉及多个液体处理步骤，这些步骤可能会影响数据质量。样品前处理的不一致性可能导致孔间、板间或重复实验之间的误差超出可接受范围。这些移液步骤非常繁琐，特别是在进行多重分析和/或大量的重复分析时，而在药物发现项目中往往会涉及这些分析实验。

例如，尽管经验丰富的操作人员可以确保细胞清洗的一致性，但手动清洗细胞仍会导致单层细胞的受损风险增加。图 1 展示了常见错误可能造成的损伤。包括刮擦单层细胞表面造成细胞损伤或丢失（图 B），移液力度过大使附着性较弱的贴壁细胞脱落（图 C），或过多移除培养基使单层细胞暴露于空气中，导致细胞损伤或脱落（图 D）。手动移液还可能引入气泡，这些气泡可能会损伤细胞或影响最终的孔体积。

Bravo 自动化液体处理平台可以自动执行多个关键的手动移液步骤，解决 Seahorse XF 分析中遇到的这些问题。研究者使用 Bravo 执行这些液体处理步骤有利于提高数据质量，减少分析前处理（手动操作）的时间。这样一来，可以获得一致性更高的数据，增加 XF 分析过程中“无人值守”的时间，进而提高分析效率。

本应用简报介绍了 XFe96 分析前处理过程涉及的关键液体处理步骤的自动化方法：清洗细胞、配制加样溶液以及将这些溶液上样至 XFe96 探针板。然后用实例说明了每个自动化步骤，包括分析数据以及“无人值守”时间带来的估计收益。

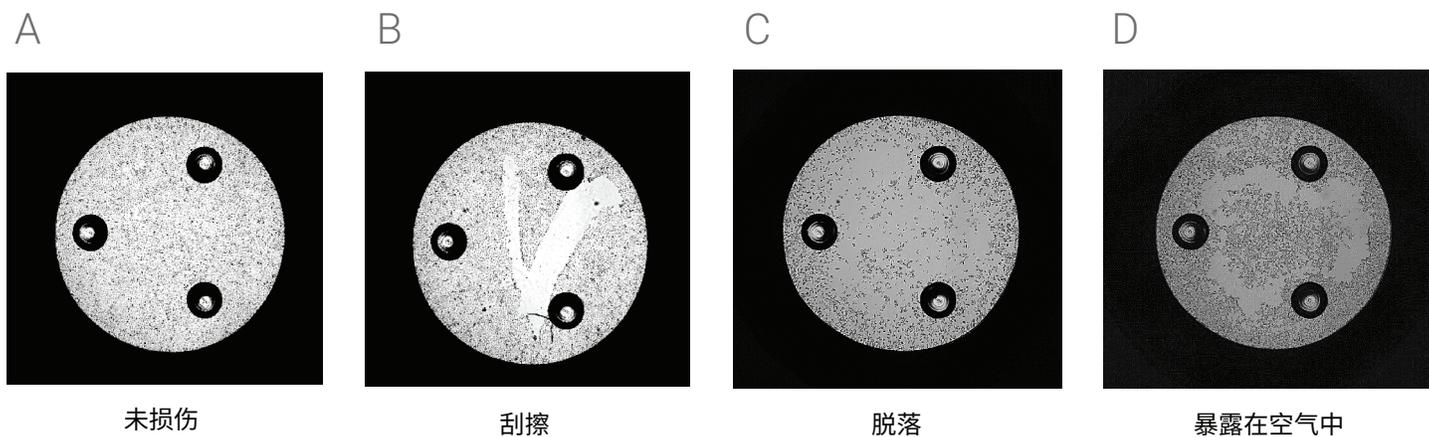


图 1. XFe96 微孔板上单个孔内细胞单层受损情况的明视场图像。A) 未损伤的细胞。B) 移液枪头刮擦的细胞。C) 吸液或排液导致细胞脱落。D) 暴露在空气中导致细胞脱落

材料与方法

细胞培养

将 HEK293 或 HepG2 细胞接种于 XF96 细胞培养微孔板中，密度分别为每孔 3.0×10^4 个细胞或 $1.5-2.0 \times 10^4$ 个细胞，于 37°C 5% CO_2 条件下培养过夜。用添加了 10% FBS 和 2 mmol/L GlutaMAX (Gibco 35050061) 的 DMEM (Gibco 11885084) 培养 HEK293 细胞，用添加了 10% FBS 的 EMEM (ATTC 30-2003) 培养 HepG2 细胞。24 小时后进行 XF 分析。

归一化

在所有分析中，最后加入浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 的 Hoescht 核染料 (Thermo Scientific, PI62249)，孔内最终浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ ，使用 BioTek Cytation 1 对微孔板成像。对每个孔的细胞核计数，使用这些细胞核数进行耗氧率 (OCR) 和细胞外酸化率 (ECAR) 数据的归一化。关于 Seahorse XF 成像和归一化系统的详情，请参阅“使用 BioTek Cytation 5 通过原位细胞计数对安捷伦 Seahorse XF 数据进行归一化” <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7908EN.pdf>。

Bravo 设置和性能测试

使用 Bravo 开展所有分析，Bravo 经过配置可与 XFe96 分析仪的相关消耗品配合使用。在此配置中，Bravo 台板的 4 号和 6 号位置具有加热模块。通过 Bravo Seahorse 分析工作台软件执行每个工作流程单元的 Bravo 方案，包括预先设定吸液和排液的速度和高度（参见表 S1 补充信息获取详情）。表 1 展示了用于 Bravo 的安捷伦实验室器皿（储液槽和试剂板）以及 XFe96 消耗品。所有的 XF 分析均采用 XF 分析培养基，该培养基由安捷伦 Seahorse XF DMEM 培养基 (pH 7.4) 添加 10 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 丙酮酸和 2 mmol/L 谷氨酰胺制成。所有手动移液步骤均按照推荐的 XF 分析方法和实践操作进行。

安捷伦实验室器皿和消耗品	部件号	一次 XFe96 分析所需的数量		
		细胞清洗	化合物稀释	探针板上样
安捷伦 24 列储液槽（聚丙烯，3.25 mL/列，金字塔形底部设计）	201296-100	–	–	1
安捷伦 96 孔储液/反应微孔板（超高纯度聚丙烯，1 mL/方孔，锥形底）	201276-100	–	2	–
安捷伦储液槽（聚丙烯，86 mL，96 个金字塔形底部设计）	201254-100	2	1	–
安捷伦枪头盒，250 μL ，96 孔排架，与 Bravo 96LT 移液头兼容（满）	19477-002	1	2	1
安捷伦枪头盒，250 μL ，96 孔排架，与 Bravo 96LT 移液头兼容（空）		–	1	1
安捷伦 Seahorse XFe96 FluxPak	102416-100	1 个细胞板 (96 孔 Seahorse XF96 细胞板)	1 个 XFe96 探针板，带工具板 (96 孔 Seahorse XF96 探针板，带工具板，384 个加药口)	
Seahorse XF DMEM 培养基 (pH 7.4)	103575-100	90 mL	40 mL	20 mL
Seahorse XF 葡萄糖 (1.0 mol/L 溶液)	103577-100	0.9 mL	0.4 mL	0.2 mL
Seahorse XF 丙酮酸 (100 mmol/L 溶液)	103578-100	0.9 mL	0.4 mL	0.2 mL
Seahorse XF L-谷氨酰胺 (200 mmol/L 溶液)	103579-100	0.9 mL	0.4 mL	0.2 mL
XF 细胞线粒体压力测试（寡霉素、FCCP、鱼藤酮/抗霉素 A）	103015-100	–	1	1
糖酵解速率测定试剂盒 (2-DG)	103344-100	–	1	1

表 1. 每一个自动化步骤所需的安捷伦实验室器皿和消耗品

细胞清洗

使用附着性较弱的 HEK293 细胞展示 Bravo 在不损伤单层细胞或不造成细胞丢失的情况下清洗细胞的能力（见图 1）。用于细胞清洗的 Bravo 台板配置和实验室器皿见图 2。简而言之，移除细胞的生长培养基，将其替换为分析培养基，并重复操作一次，最终每孔体积为 180 μL 。在 Seahorse XFe96 分析仪上进行三次基础测量并进行评估。

加药口上样

手动配制用于 XF 细胞线粒体压力测试的寡霉素、FCCP、抗霉素 A/鱼藤酮储备液，并将溶液分至 24 列储液槽（安捷伦，201296-100）。利用 Bravo 将 20 μL 、22 μL 或 25 μL 的这些溶液分别转移至 XFe96 探针板的 A、B 和 C 加药口。图 3 展示了用于 XFe96 探针板上样的 Bravo 台板配置。这一系列分析的所有细胞清洗步骤均通过 Bravo 按如前所述的步骤执行。

加样溶液配制 — FCCP 自定义稀释

在 96 孔聚丙烯储存板（安捷伦，201276-100）中稀释溶液。用于化合物稀释和 XFe96 探针板上样的 Bravo 台板配置如图 4 所示。对 FCCP 进行自定义 10 步连续稀释，最终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 至 20 $\mu\text{mol/L}$ ，稀释间隔为 2 $\mu\text{mol/L}$ 。在化合物库母板上用 XF 分析培养基手动配制 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 FCCP 储备液。Bravo 直接将 100 $\mu\text{mol/L}$ 储备液加入到稀释板进行 FCCP 稀释，然后自动上样至 XFe96 探针板的“B”加药口。所有的 FCCP 处理均在存在 1 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素的条件下进行。利用 Bravo 将 20 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素加样溶液上样至所有 A 加药口，将 25 μL 鱼藤酮/抗霉素 A 溶液（各 5.0 $\mu\text{mol/L}$ ）上样至所有 C 加药口，以完成标准的 XF 线粒体压力测试 (MST)。在另一天重复此 FCCP 剂量响应实验（重复两次）。

加样溶液配制 — 抗霉素 A 连续稀释

将溶解于 DMSO 的 50 mmol/L 抗霉素 A (AA, Sigma A8674-25) 用 XF 分析培养基稀释为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AA 储备液。后续稀释通过 Bravo 平台在安捷伦 96 孔储存板 (#201276-100) 中进行。在同一微孔板上平行配制 8 组相互独立但相同的抗霉素 A 系列稀释液。每组稀释液采用从左至右的 10 步 2 倍连续稀释，使加药口的浓度范围为 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 至 10 $\mu\text{mol/L}$ 。使用 Bravo 将 AA 稀释液上样至 XFe96 探针板的“A”加药口。进行三次独立分析。

台板布局



图 2. 用于细胞清洗的 Bravo 台板配置和实验室器皿

台板布局

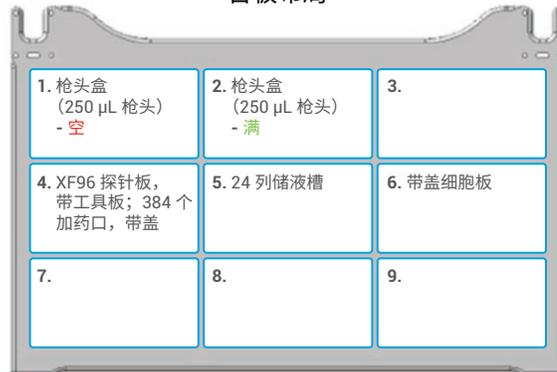


图 3. 用于加药口上样的 Bravo 台板配置和实验室器皿

台板布局



图 4. 用于连续稀释的 Bravo 台板配置和实验室器皿

从化合物库筛选线粒体和糖酵解抑制剂

对来自 Selleck-Pfizer 库 (Selleckchem.com, 部件号 L2400, Pfizer 许可的化合物库) 的共 72 种化合物进行线粒体和糖酵解抑制作用筛选。在这个小型筛选实验中, 使用 Bravo: 1) 清洗细胞, 2) 对 96 孔母板中的化合物进行 100 倍稀释, 3) 将 20 μL 稀释后的化合物溶液加至 XF96 探针板 A 加药口。Seahorse XFe96 分析进行三次速率测量 (基础 OCR 和 ECAR), 随后加入测试化合物 (最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 再进行九次速率测量。最后测得的 OCR 和 ECAR 值 (12 号) 用于确定抑制活性。

三个 XF 分析平行进行, 以获得技术重复微孔板。将此方法重复三次, 共获得 9 个技术重复 (即 9 个独立的微孔板)。使用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 抗霉素 A/鱼藤酮 (AA/Rtn) 混合物作为 OCR 抑制的阳性对照, 50 mmol/L 2-脱氧葡萄糖 (2-DG) 作为 ECAR 抑制的阳性对照, 0.1% DMSO (最终浓度) 作为载体对照, 获得数据质量的 Z' 值。

结果与讨论

不论针对何种特定应用或使用何种试剂盒, Hoescht 核染料 (Thermo Scientific, PI62249) Seahorse XF 分析具有相同的样品前处理流程:

- 在 XF96 细胞培养微孔板中接种细胞
- 清洗细胞 (用分析培养基替换生长培养基)
- 化合物前处理 (稀释)
- 化合物上样至 XF96 探针板

这些均是常规的工作流程步骤, 涉及大量的移液操作, 可能会给分析带来误差。因此, 有必要实现这些步骤的自动化。

本项目重点研究 b-d 步骤, 以评估 Bravo 自动化技术在 Seahorse XFe96 分析中对活细胞培养后的样品前处理过程的实用性。之前的研究已经证明, 利用 Bravo 自动接种细胞可以提高分析的可靠性 (Gestin 等)。虽然 Bravo 可以安装在生物安全柜中, 但本实验室中未将其安装在生物安全柜中, 因此没有评估其自动化细胞接种性能。

图 5 展示了 Seahorse XF 分析的整体工作流程。



图 5. Seahorse XF 分析的一般工作流程。用 Bravo 实现自动化的样品前处理步骤用绿色表示: 清洗细胞、加样溶液的配制和 Seahorse XFe96 探针板上样。每板可节省 20-60 分钟的手动操作时间

清洗细胞

使用贴壁细胞进行 XF 分析之前需清洗细胞，去除生长培养基，替换成细胞 XF 分析培养基。为了验证自动化系统是否可对细胞实现一致清洗，且不损伤或丢失细胞，利用附着性较弱的 HEK293 细胞进行测试。清洗细胞时，培养基加入过快和/或移液枪头不小心碰到单层细胞均可能使附着性较弱的细胞脱落。Bravo 可以设定距离孔底的高度，以避免接触细胞层。此外，可以设定吸取和排放分析培养基的速度，从而将细胞从 XF96 细胞培养微孔板上脱落的风险降至最低。

为了评估自动细胞清洗的性能，使用 HEK293 细胞进行 XF 分析，测量基础呼吸（耗氧率，OCR）和酸 (H⁺) 的生成（细胞外酸化率，ECAR）（图 6）。所展示的数据表明，Bravo 能够执行一致的细胞清洗步骤。在所示的实例中，采用 Bravo 进行清洗后获得的归一化速率在孔与孔之间没有显著差异（图 6B）。此外，三天内重复分析的数据表明，每一天的 ECAR 值具有较高的一致性，标准误差低。这一数据表明，使用 Bravo 清洗细胞很好地维持了细胞单层的完整性（图 6C）。此外，在细胞清洗过程之前，Bravo 还成功地清洗了附着在具有 Cell-Tak 的 XF96 细胞培养微孔板上的悬浮细胞（数据未展示）。

Bravo 通过控制枪头在孔内的高度和液体吸取或排放的速度，最大程度降低了单层细胞受损风险（如图 1 所示）。这可以改善孔内剩余体积的一致性，防止细胞被刮掉或从孔表面脱落，并可防止气泡的形成。此外，在整个细胞清洗过程中，培养基和细胞板保持在 Bravo 台板上，温度保持在 37 °C。这一过程最大程度降低了细胞和分析培养基的温度变异性，进一步减少了引入分析结果的误差。

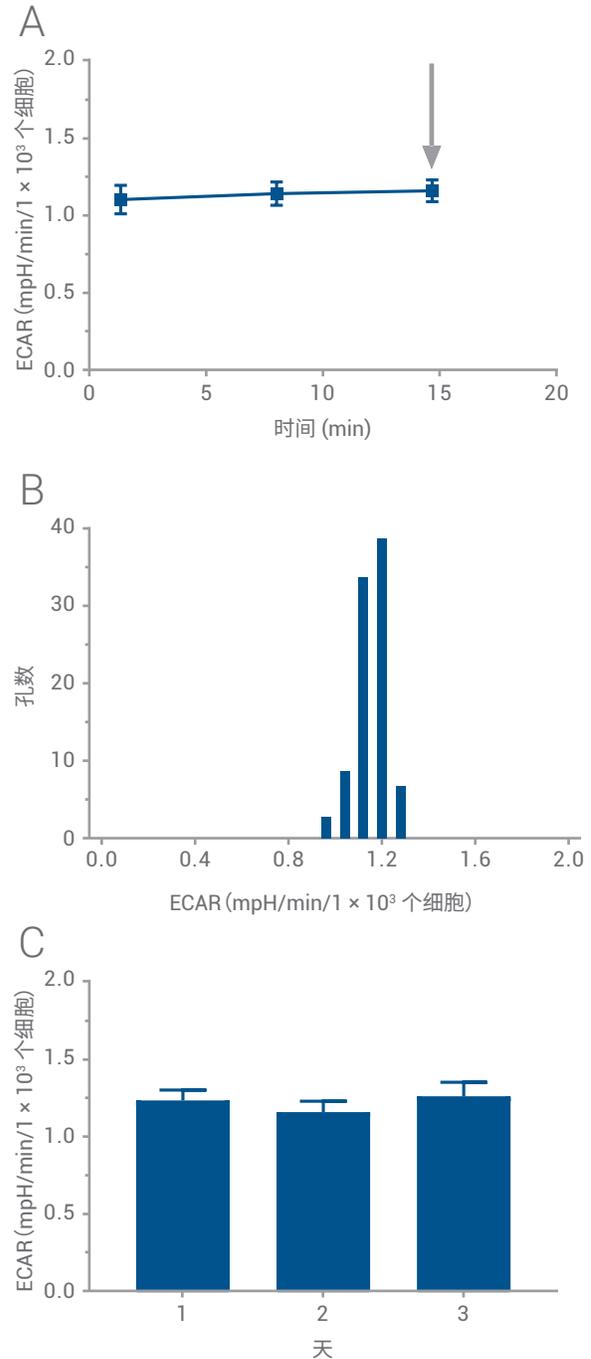


图 6. 自动化细胞清洗方案测试。将 HEK293 细胞接种至微孔板，使用 Bravo 自动清洗细胞，然后进行 Seahorse XF 分析。使用第三次的速率测量值进行数据比较。A) 归一化的基础 ECAR（无加样）XF 分析结果。箭头表示的是图 B 和图 C 中使用的数据。B) 单个 XF96 微孔板（n = 92 孔）ECAR 值的柱状图（测量值 3）。C) 三天内进行三次重复测定得到的 ECAR 值（测量值 3）。数据表示为平均值 +/- STDEV (n = 92)

加药口上样

Seahorse XF 分析前通常需要对探针板的一个或多个加药口上样。对于给定的一系列加药口（如所有“A”加药口等），上样的加样溶液体积应相同，以确保加样的准确性和精确性，从而得到每孔中相同的药物浓度。此外，加药口上样时必须小心，以免液体通过加药口底部泄漏。

为了验证 Bravo 上样的准确性与一致性，我们开展了包含三次连续加样步骤的 XF 细胞线粒体压力测试 (MST)。分析了最大呼吸（图 7A，箭头），因为该参数对 FCCP 浓度的微小变化非常敏感。

图 7 表明，在对探针板加药口进行加样溶液上样时，Bravo 可以实现上样的准确性和一致性。根据对每个孔的分析，最大响应（对 FCCP 浓度的微小变化极为敏感的指标）显示出几乎相同的呼吸速率和对 MST 加样的响应（图 7B）。最后，在另一天再次重复此分析。数据显示，每天的 OCR 值具有较好的一致性，且标准误差较低（图 7C）。综上所述，Bravo 可以一致地将加样溶液上样到指定的加药口，以支持从加药口完全加入溶液。

加药口上样的准确性和一致性对获得高质量数据至关重要。虽然熟练的操作人员能够准确一致地上样，但仍有出错风险，并且实际操作技能也因人而异。不正确的上样可能导致加样失败或化合物在加样前便从加药口泄漏。部分加样或加样体积错误将导致孔中浓度低于预期。泄漏将导致在分析中出现早于预期的意外响应，这些数据通常不适合进行分析。Bravo 可以确保加入体积的准确性，且不产生气泡或使用过大压力，从而可为所有 XF 分析一致地执行此步骤。它还能进一步降低用户出错的风险，如移液枪头和/或加药口的交叉污染。

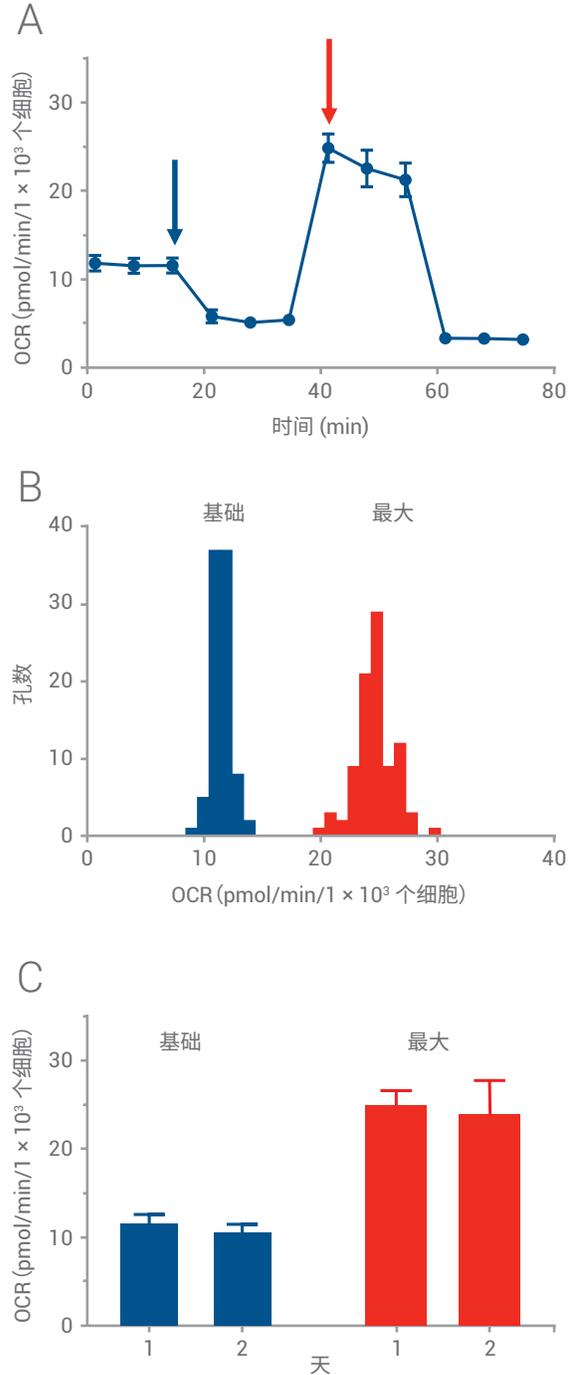


图 7. 自动化加药口上样评估。将 HepG2 细胞接种于 XF96 细胞培养微孔板中，培养 24 小时后进行分析。配制寡霉素、FCCP、鱼藤酮/抗霉素 A 的 MST 加样溶液，并上样至 XF 探针板。A) 细胞线粒体压力测试结果，箭头表示图 B 和 C 中所用的基础（蓝色）和最大（红色）呼吸速率。B) 单个 XF96 微孔板 (n = 92 孔) 归一化的基础和最大 OCR 值（测量值 3 和 7）的柱状图。C) 两次单独分析获得的归一化的平均基础 OCR 值和最大 OCR 值（测量值 3 和 7）。数据表示为平均值 \pm STDEV (n = 92)

连续稀释和剂量响应试验

表征一系列化合物或候选药物时，通常要进行剂量响应试验来评估估价（如 IC_{50} 或 EC_{50} ）。Bravo 可以最大程度减少准备和执行复杂的稀释矩阵分析所需的手动操作需求（和相关风险），从而促进这一过程。

采用两种试验设计来测试 Bravo 生成剂量响应矩阵的能力，包括：1) 单个微孔板内的技术重复（图 8 和图 9）以及 2) 多个微孔板间的技术重复（图 10 和图 11）。

如前所述，细胞呼吸速率对 FCCP 浓度的微小变化非常敏感，尤其是在接近最大浓度时。因此，在较窄的 FCCP 浓度范围内进行剂量响应试验，能够可靠地测试 Bravo 用于剂量响应试验准备过程的精确性。

为了检测微孔板内的技术重复（图 8），通过 MST 测量 HepG2 的呼吸速率对 0.0–2.0 $\mu\text{mol/L}$ （增量为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ）FCCP 的响应。在这个狭窄的浓度范围内，最大呼吸（图 9A，箭头）呈线性增加，1 $\mu\text{mol/L}$ FCCP 时 OCR 达到最大，在 2 $\mu\text{mol/L}$ FCCP 时略有下降（图 9B）。每一个浓度都能获得不同响应且 CV 较低，证明 Bravo 在进行此自定义连续稀释时具有极高的精确性。当进行多天 ($N = 2$) 测试时，所得数据显示，对 FCCP 的响应具有一致性，所有剂量的 CV 值均小于 10%（图 9B 和 9C）。

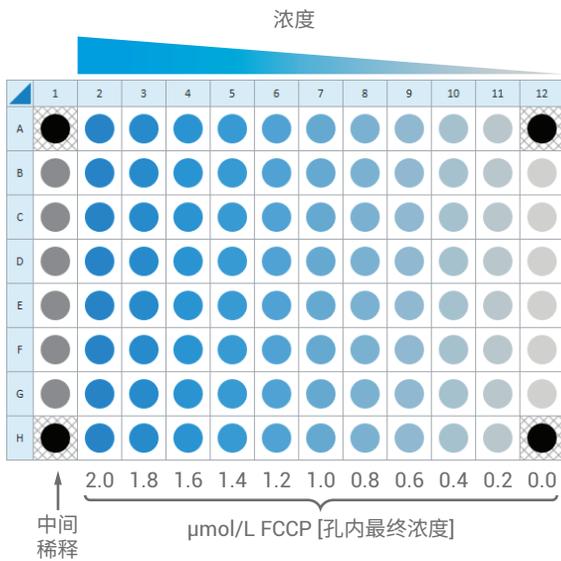
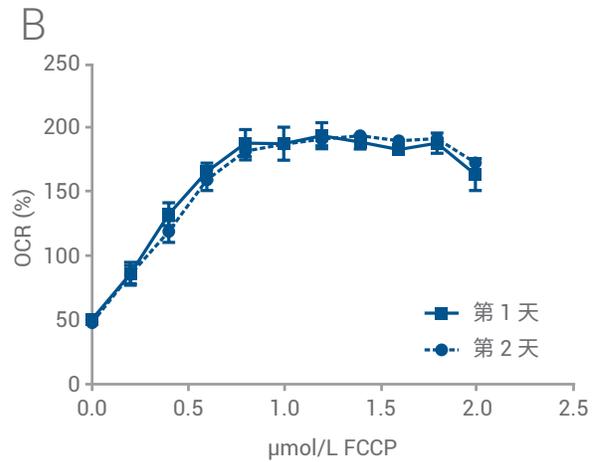
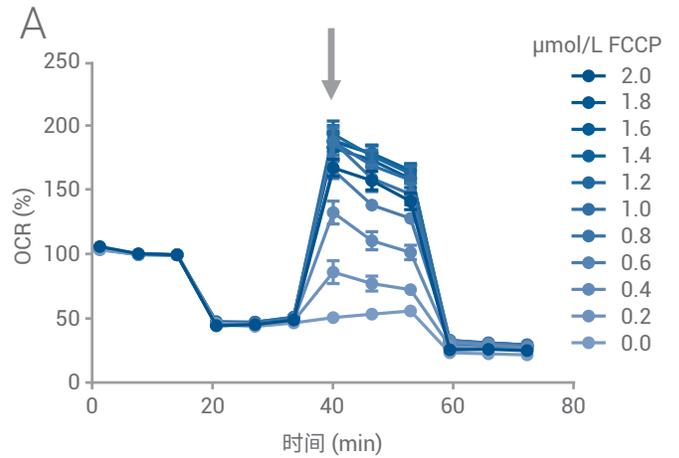


图 8. 在单个微孔板内测试技术重复的板布局。使用单一化合物 (FCCP) 进行 XF 剂量响应试验设计。试验包括 10 步稀释，FCCP 的最终浓度为 0.0–2.0 $\mu\text{mol/L}$ ，每个浓度有 8 个技术重复



C

第 1 天			$\mu\text{mol/L}$ FCCP	第 2 天		
%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

图 9. 一个微孔板内的技术重复。在较窄的 FCCP 浓度范围 (0–2 $\mu\text{mol/L}$ ，增量为 0.2 $\mu\text{mol/L}$) 内分析其对 HepG2 细胞的影响。利用 Bravo 配制 FCCP 加样溶液，并将其上样至探针板。A. FCCP 浓度与 OCR 响应的动力学曲线。B. 两次独立实验的 FCCP 剂量响应曲线， $N = 8$ （每条数据曲线为 8 行 \times 1 个微孔板）。C. 所有测试浓度条件下的 %OCR、STDEV 和 %CV 值，按天进行比较

还评估了在多个微孔板间进行技术重复测定获得的效价测定结果的一致性。利用 Bravo 对 AA 进行 10 步两倍连续稀释 (图 10A), 并将得到的溶液上样至 XF96 探针板 “A” 加药口。每组连续稀释均独立进行, 即使用 Bravo 的 8 个不同枪头同时对包含 8 个 AA 储存孔的母板进行稀释, 得到独立的稀释液组 AA1-AA8。

执行 XF 分析: 记录三个基础测量值, 加入 AA, 然后记录后续三个速率测量值 (图 10B)。以测量值 7 与测量值 3 (定义为 100%) 处的速率比值计算响应, 绘制 %OCR 对 $\mu\text{mol/L}$ AA 的曲线, 计算出每组稀释液的 IC_{50} 值 (图 10C)。结果表明, 通过 Bravo 配制的各组 AA 稀释液的响应值具有一致性, 同一板、不同板或同一天、不同天的平均 IC_{50} 值非常接近。

总的来说, 模型剂量响应试验数据表明, Bravo 平台在对化合物进行复杂的连续稀释时具有很好的重现性。这种重现性增加了单个重复板提供的响应的可靠性, 从而可对多个重复微孔板的剂量响应试验数据进行组合。如前所述, 手动稀释会增加溶液转移时的体积微小差异 (将通过稀释步骤被放大) 风险, 还会增加化合物交叉污染的几率。Bravo 能确保准确转移小体积溶液, 且不会造成样品交叉污染。最后, Bravo 可以通过自动化步骤一步实现 XF 探针板加药口上样 (手动操作需要多个步骤), 从而进一步减少相关的变异性或误差。

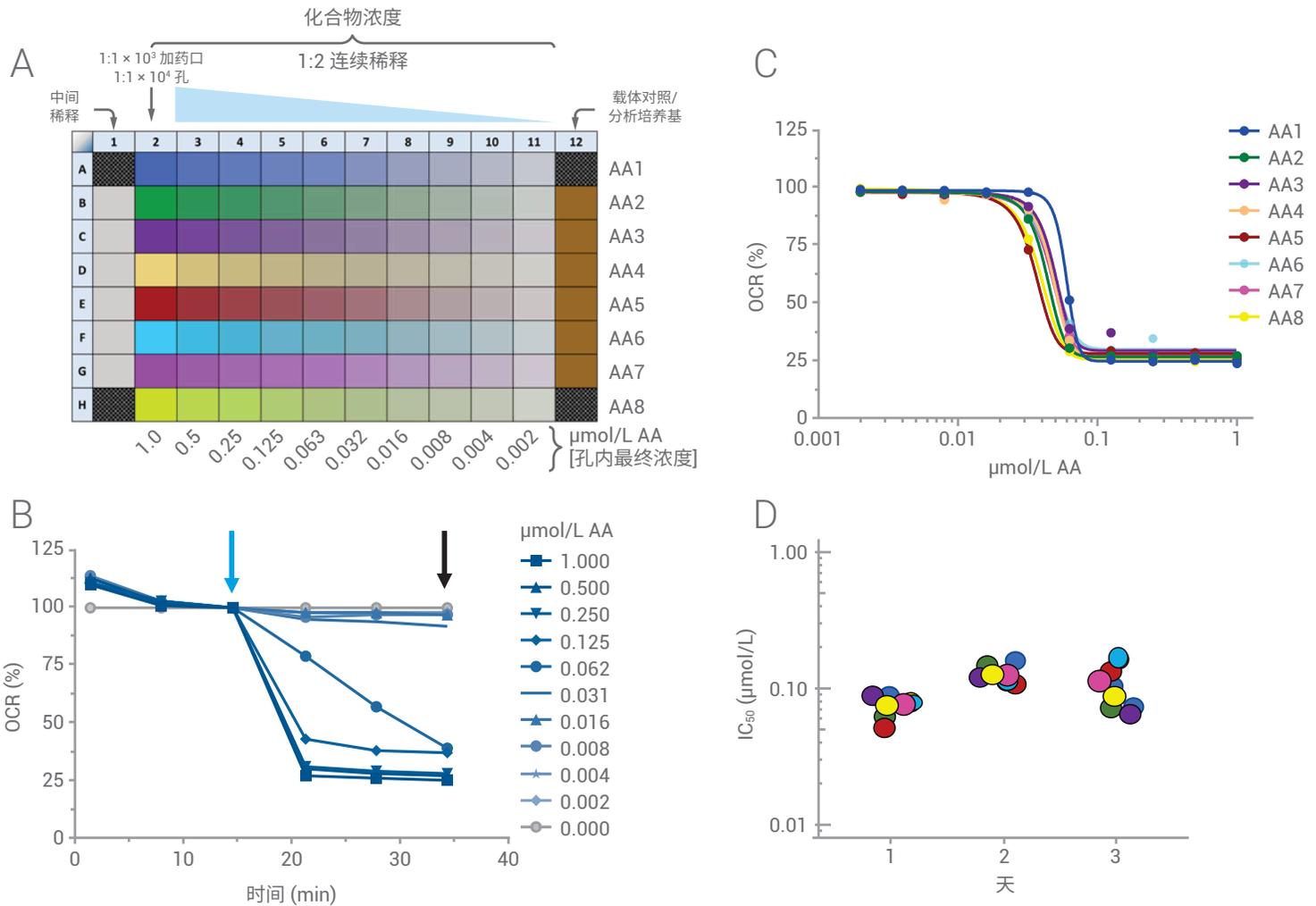


图 10. 化合物剂量响应试验。A. 8 个单独配制的 AA 稀释液组, 标记为 AA1、AA2...AA8。每组采用 10 步 2 倍连续稀释, AA 最终浓度为 0.002-1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。在微孔板底部标明最终浓度。B. 一个稀释液组 (AA1) 的 XF 动力学数据。C. 由一个微孔板获得的剂量响应曲线 (AA1-AA8)。D. 抗霉素-A 滴定性能。根据图 A 中的分析布局, 对每一行计算 IC_{50} 值。每个点表示从单个稀释液组 (微孔板上的一行) 计算得到的 IC_{50} 值。行与行之间和天与天之间获得的数据一致性良好

化合物库筛选 — 急性抑制试验

对一个小型化合物库进行线粒体和糖酵解抑制剂筛选，以此展示完整的自动化工作流程。对来自 Selleck-Pfizer L2400 库的 72 种化合物（图 11，上图）进行线粒体和糖酵解活性抑制筛选。Bravo 将对测试化合物进行稀释，使最终孔内浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ ，然后将测试化合物和对照化合物上样至加药口。

在 Seahorse XFe96 分析仪中，与之前一样测量 HepG2 的基础速率，然后加入库化合物，记录 1 小时内的急性 OCR 和 ECAR 响应（图 11，下图）。以 80 分钟时的速率（蓝色箭头）与化合物加样前的速率（橙色箭头）的比值计算响应值，以相对于化合物加样前速率的百分比 (%) 表示。本试验每天重复三次，共测试三天，获得 9 个重复筛选板。

Z' 值是分析性能的标准指标，因此对每个重复板的两个主要输出数据计算该值（图 12）。对线粒体的抑制效果，以 AA/Rtn 混合物作为阳性对照。对糖酵解的抑制效果，以 2-脱氧葡萄糖 (2-DG) 作为阳性对照。线粒体抑制试验的平均 Z' 值为 0.88，糖酵解抑制试验的平均 Z' 值为 0.77，表明试验设计和执行过程均非常可靠。

对于化合物库，以相对 OCR(%) 或 ECAR(%) 作为响应值作图（图 13）。每种化合物响应值的误差线（代表 SD）较低，表明抑制试验在板与板之间以及天与天之间都有很高的重现性。该重现性和 Z' 值表明，Bravo 自动化液体处理和 Seahorse XFe96 平台是检测线粒体和糖酵解抑制剂的一种可靠方法。

在图 11 所示的实验设计中，分别在加入化合物前和加入后 1 小时内对同一孔内的细胞进行检测。此平台还支持 XF 分析之前的试验设计和执行，其中使用化合物处理细胞（慢性暴露），以获得化合物处理的长期动力学效应。在这种情况下，Bravo 将在 XF 分析之前，于预定的时间（例如提前 24 小时）将化合物直接加入到含有感兴趣细胞的 XF 细胞培养微孔板中。

	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	无细胞
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	AM	2-DG	无细胞
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	VEH	AA/Rtn	无细胞
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	VEH	AA/Rtn	无细胞
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

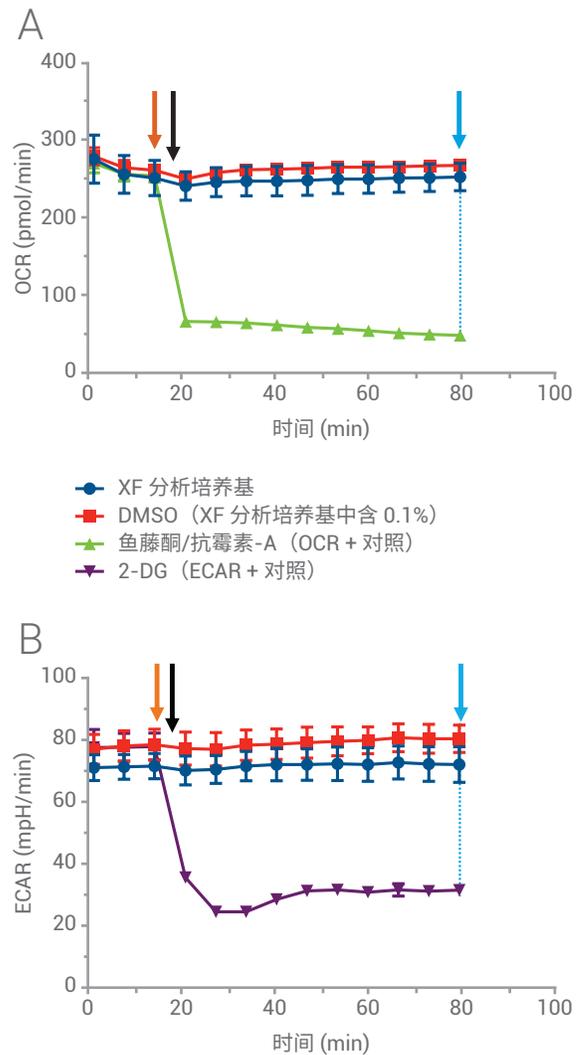


图 11. 化合物库筛选。上图：XFe96 孔板分布图。化合物以数字 (1-72) 标识，AM：分析培养基；VEH：DMSO 对照；2-DG：ECAR 阳性对照；Rtn/AA：OCR 阳性对照。下图：XF 分析的 OCR (A) 和 ECAR (B)，黑色箭头表示加样时间。用于计算百分比响应值的数据点分别用橙色箭头 (100%) 和蓝色箭头表示

天-板	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
Z' 平均值	0.88	0.77

总结

本应用简报介绍了用于 XF 分析样品前处理的自动化液体处理方法及其性能。Bravo 平台可以实现细胞清洗、加样溶液配制和探针板加药口上样步骤的自动化，有利于获得高准确性和一致性的数据。Bravo 平台还具有以下优势：1) 减少与重复手动移液步骤相关的人为误差，2) 提高微孔板内和微孔板间数据质量的一致性和可靠性，3) 减少“手动”准备 XF 分析的时间。实现了 XF 分析中关键手动液体处理步骤的自动化，从而使 XF 分析工作流程更为高效，同时提高了结果数据的质量。

图 12. 重复急性抑制试验的 Z' 值。三天内各进行三次重复试验得到的 OCR 抑制对照（鱼藤酮/AA）和 ECAR 抑制对照（2-DG）的 Z' 值（n = 9/化合物）

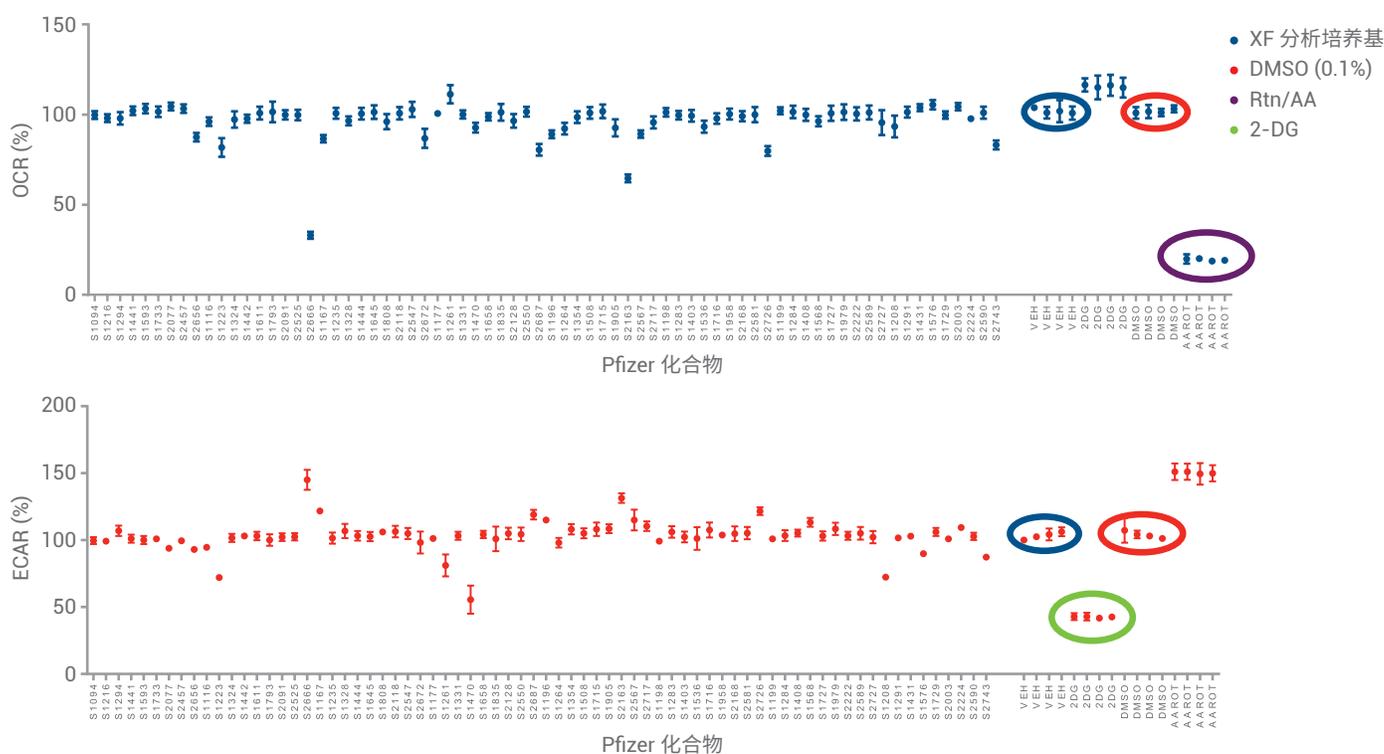


图 13. 使用 Selleck-Pfizer L2400 库的化合物库进行急性抑制试验得到的结果。上图为线粒体活性响应值 (%OCR)，下图为糖酵解活性响应值 (%ECAR)。还展示了阳性对照化合物鱼藤酮/抗霉素-A (OCR 抑制剂, 紫色) 以及 2-DG (ECAR 抑制剂, 绿色) 的响应。对载体对照 (0.1% DMSO) 的 OCR 和 ECAR 响应值用红色圈出

补充材料

Bravo 自动化液体处理平台与 XFe96 和 XF96 分析仪配合使用的指标要求 (所有高度均相对于指定板的底部或表面测量)	
在细胞板中的吸液高度	3 mm
吸液速度:	
XF96 细胞板	“固定枪头 51–200 μ L”
储液槽 (86 mL)	默认值
储存板 (96)	默认值
24 列储液槽	默认值
排液高度:	
储液槽 (86 mL)	2 mm
XF96 探针板	0.5 mm
排液速度:	
XF96 细胞板	“固定枪头缓慢清洗”
储液槽 (86 mL)	默认值
XF96 探针板	“384 一次性枪头 10–50 μ L”

表 S1. Agilent Bravo 自动化液体处理平台与安捷伦 Seahorse XFe96 分析仪配合使用的指标要求

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/chem/discoverxf

仅限研究使用。
不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。