

Maximale Effizienz und Leistung: Seahorse XF Analysen mit der Bravo Automated Liquid Handling Plattform

Autoren

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

Zusammenfassung

Dass manuelle Probenvorbereitungsschritte Auswirkungen auf die Qualität von Analysedaten haben, ist bekannt. Dies gilt ganz besonders für zellbasierte Analysen. Bei der manuellen und dazu zeitaufwändigen Probenvorbereitung (einschließlich der Pipettierschritte) können sich Fehler einschleichen. Mit dem automatisierten Liquid Handling für die Vorbereitung von Proben für Agilent Seahorse XF Analysen können mögliche Fehler vermieden und die praktischen Vorbereitungsschritte verkürzt werden. Im Rahmen eines Arbeitsablaufs für Routineanalysen sorgt die Agilent Bravo Automated Liquid Handling Plattform (Bravo) für: 1) weniger Variabilität in Folge manueller Fehler, 2) bessere Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Mikroplatte bzw. mehrerer Mikroplatten, 3) weniger Zeitaufwand für die Vorbereitung von XF Analysen. Insgesamt führt die Automatisierung der Liquid-Handling-Schritte einer Seahorse XF Analyse zu effizienteren Arbeitsabläufen bei der Probenvorbereitung und zu einer besseren Übereinstimmung der Ergebnisdaten. Dies ist besonders für den Bereich der Wirkstoffforschung z. B. bei Routineabläufen im Bereich des Wirkstoffscreening und in Dosis/Wirkungs-Studien von Vorteil.

Einführung

Bei zellbasierten Analysen fallen häufig mehrere Liquid-Handling-Schritte an, die die Datenqualität beeinflussen können. Variabilität bei der Probenvorbereitung führt zu inakzeptabler Variabilität im Vergleich von Wells, Platten und Replikaten. Außerdem kann der Zeitaufwand für diese Pipettierschritte hoch sein. Dies gilt ganz besonders für Multiplex-Analysen oder Analysen mit vielen Replikaten, die bei Projekten im Rahmen der Wirkstoffforschung häufig erforderlich sind.

Beispielsweise kann ein manuell geschulter Anwender Zellwaschungen ohne große Variabilität durchführen. Trotzdem ist bei der manuellen Waschung von Zellen die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass der Monolayer der Zellen beschädigt wird. Solche Schäden sind das Ergebnis häufiger Fehler, die in Abbildung 1 dargestellt werden. Dazu gehören eine Beschädigung oder ein Verlust von Zellen durch Ankratzen der Monolayer-Oberfläche (Tafel B), ein Lösen von schwach haftenden Zellen durch starkes Pipettieren (Tafel C) oder die Entfernung von zu viel Medium, sodass der Monolayer Luft ausgesetzt ist und so beschädigt wird bzw. sich ablösen kann (Tafel D). Beim manuellen Pipettieren können außerdem Luftblasen entstehen, die die Zellen beschädigen oder eine Auswirkung auf das Endvolumen der Wells haben.

Bei der Durchführung von Seahorse XF Analysen können diese Probleme durch Automatisierung mehrerer wichtiger Pipettierschritte mit der Bravo Automated Liquid Handling Plattform vermieden werden. Die Durchführung dieser Liquid-Handling-Schritte mit der Bravo Plattform verbessert die Datenqualität und reduziert die für die praktischen Schritte notwendige Vorbereitungszeit, was einen Mehrwert für Forscher bedeutet. Diese beiden Vorteile sorgen – dank der besseren Datenübereinstimmung und dem längeren unbeaufsichtigten Betrieb während der XF Analyse – für eine höhere Produktivität.

In dieser Application Note werden Methoden für die Automatisierung von drei wichtigen Liquid-Handling-Schritten im Rahmen der Vorbereitung von XFe96 Analysen besprochen: das Waschen von Zellen, die Herstellung von Injektionslösungen und das Laden dieser Lösungen in die XFe96 Sensorkartusche. Anschließend werden die Automatisierungsschritte anhand von Beispielen (einschließlich Analysedaten und Schätzungen der unbeaufsichtigten Betriebsdauer) verdeutlicht.

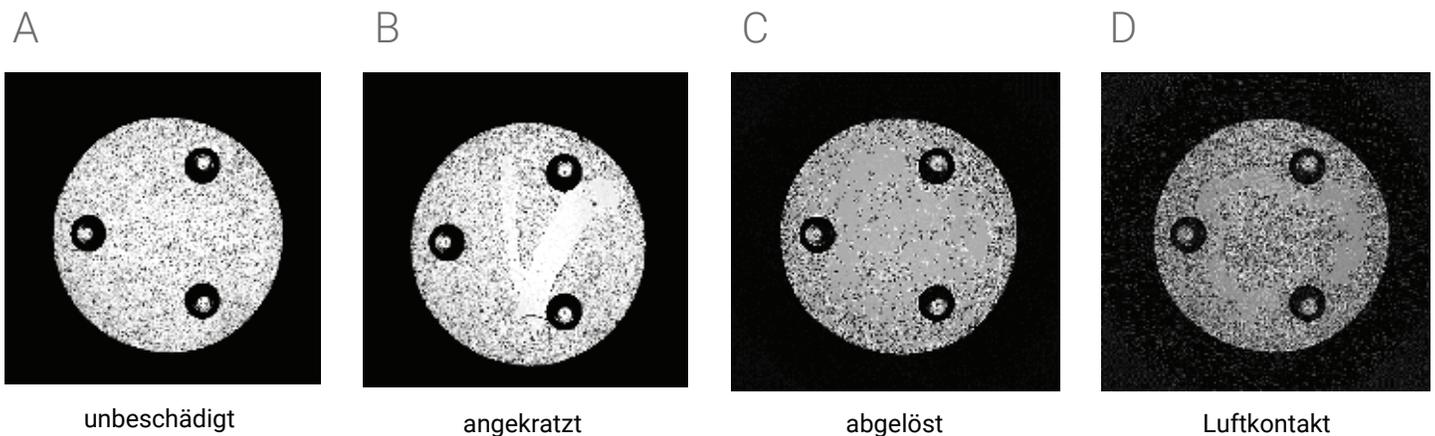


Abbildung 1: Hellfeld-Bilder von einzelnen Wells in einer XF96 Mikroplatte zur Darstellung von Beschädigungen der Monolayer-Zellen. A) Unbeschädigte Zellen. B) Pipettenspitzenkratzer. C) Ablösung bei der Aspiration oder Abgabe. D) Ablösung durch Luftkontakt.

Materialien und Methoden

Zellkultur

HEK293- oder HepG2-Zellen wurden auf XF96 Zellkultur-Mikroplatten mit einer Dichte von $3,0 \times 10^4$ bzw. $1,5-2,0 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät und über Nacht bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. HEK293-Zellen wurden in DMEM (Gibco 11885084) mit $10\% \text{FBS}$ und 2mM GlutaMAX (Gibco 35050061) angezogen. HepG2-Zellen wurden EMEM (ATTC 30-2003) mit $10\% \text{FBS}$ angezogen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf die XF Analyse vorbereitet.

Normalisierung

Bei allen Analysen wurde Hoechst Zellkernfärbemittel (Thermo Scientific, PI62249) mit einer Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ ($2 \mu\text{g/ml}$ im Well) bei der letzten Injektion zugegeben. Die Mikroplatten wurden mit dem Bildgebungssystem BioTek Cytation 1 ausgewertet. Die Zellkerne in jedem Well wurden ausgezählt. Die Daten der Sauerstoff-Verbrauchsrate (OCR) und der extrazellulären Azidifizierungsrate (ECAR) wurden mithilfe dieser Zellkernzählung normalisiert. Das Seahorse XF Imaging- und Normalisierungssystem wird in der Application Note „Normalization of Agilent Seahorse XF Data by In-situ Cell Counting Using a BioTek Cytation 5“ (Normalisierung von Agilent Seahorse XF Daten durch In-situ-Zellzählung mit einem BioTek Cytation 5) näher beschrieben (<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7908EN.pdf>).

Konfiguration und Leistungsüberprüfung der Bravo Plattform

Alle Analysen wurden mit einer Bravo Plattform durchgeführt, die mit Verbrauchsmaterialien für einen XFe96 Analyser bestückt wurde. In dieser Konfiguration befinden sich Blockheizungen in den Positionen 4 und 6 im Bravo Deck. Die Bravo Seahorse Assay Workbench Software implementiert die Bravo Protokolle für jedes Element des Arbeitsablaufs. Dazu gehören zum Beispiel die Voreinstellungen der Aspirations- und Abgabegeschwindigkeiten und Höhen (siehe Tabelle S1 im Anhang „Zusatzinformationen“). Die Agilent Laborgeräte (Reservoirs und Reagensplatten) für die Bravo und XFe96 Verbrauchsmaterialien werden in Tabelle 1 zusammengefasst. Alle XF Analysen wurden mit XF Analysemedium (Agilent Seahorse XF DMEM-Medium + 10mM Glucose , 1mM Pyruvat , 2mM Glutamin , $\text{pH } 7,4$) durchgeführt. Jegliche manuellen Pipettierschritte wurden gemäß den empfohlenen XF Analysemethoden und -praktiken durchgeführt.

Agilent Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	Bestellnummer	Für XFe96 Analyse erforderliche Menge		
		Zellwaschung	Substanzverdünnung	Cartridge-Beladung
Agilent Reservoir mit 24 Säulen (Polypropylen, 3,25 ml/Säule, pyramidale Geometrie)	201296-100	–	–	1
Agilent 96-Well-Mikroplatte zur Aufbewahrung/für Reaktionen (Polypropylen ultrahoher Reinheit, 1 ml/quadratisches Well, konische Böden)	201276-100	–	2	–
Agilent Reservoir (Polypropylen, 86 ml, Geometrie basiert auf 96 Pyramiden)	201254-100	2	1	–
Agilent Spitzenbox, 250 μl , 96/Rack, kompatibel mit Bravo 96LT-Kopf (voll)	19477-002	1	2	1
Agilent Spitzenbox, 250 μl , 96/Rack, kompatibel mit Bravo 96LT-Kopf (leer)		–	1	1
Agilent Seahorse XFe96 FluxPak	102416-100	1 Zellplatte (96 Seahorse XF96 Zellplatte)	1 XFe96 Cartridge mit Hilfsplatte (96 Seahorse XF96 Kartusche mit Hilfsplatte, 384 Ports)	
Seahorse XF DMEM-Medium, $\text{pH } 7,4$	103575-100	90 ml	40 ml	20 ml
Seahorse XF Glucose (Lösung, 1 M)	103577-100	0,9 ml	0,4 ml	0,2 ml
Seahorse XF Pyruvat (Lösung, 100 mM)	103578-100	0,9 ml	0,4 ml	0,2 ml
Seahorse XF L-Glutamin (Lösung, 200 mM)	103579-100	0,9 ml	0,4 ml	0,2 ml
XF Zell Mito Stresstest (enthält Oligomycin-, FCCP- und Rotenon/Antimycin-A-)	103015-100	–	1	1
Glykolyserate-Assay Kit (enthält 2-DG-)	103344-100	–	1	1

Tabelle 1: Agilent Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien für jeden Automatisierungsschritt.

Zellwaschung

Die adhärenenten HEK93-Zellen, die nur lose haften, dienen als Modellzelllinie, um zu zeigen, wie die Bravo Plattform Zellen ohne Beschädigung des Monolayer und ohne Verluste waschen kann (beschrieben in Abbildung 1). Die Bravo Deck Konfiguration und die für die Zellwaschung verwendeten Laborgeräte sind in Abbildung 2 dargestellt. Kurz zusammengefasst wird zur Zellwaschung zweimal Wachstumsmedium aspiriert und mit Analysemedium ersetzt. Das Endvolumen im Well beträgt 180 µl. Der Seahorse XFe96 Analyzer führte drei Basalmessungen und wertete diese aus.

Beladung der Injektionsports

Die Stammlösungen der XF Mito Stresstest Testreagenzien (Oligomycin, FCCP und Antimycin-A/Rotenon) wurden manuell hergestellt und in ein Reservoir mit 24 Säulen (Agilent, 201296-100) gegeben. Mit der Bravo Plattform wurden dann 20 µl Oligomycin-Lösung in die A-Ports, 22 µl FCCP-Lösung in die B-Ports und 25 µl Antimycin-A/Rotenon-Lösung in die C-Ports einer XFe96 Sensorcartridge überführt. Die Bravo Deck Konfiguration und die XFe96 Sensorcartridge sind in Abbildung 3 dargestellt. Alle Zellwaschschritte für diese Analyseserie wurden von der Bravo Plattform durchgeführt, wie oben beschrieben.

Herstellung der Injektionslösung – individuelle Verdünnung von FCCP

Die Verdünnungen wurden in 96-Well-Aufbewahrungsplatten aus Polypropylen (Agilent, 201276-100) hergestellt. Die Bravo Deck Konfiguration für die Substanzverdünnung und die Beladung der XFe96 Sensorkartusche sind in Abbildung 4 dargestellt. Es wurde eine individuelle 10-stufige FCCP-Verdünnungsserie hergestellt. Die Verdünnung erfolgte in 2-µM-Schritten (2 µM bis 20 µM). Für alle Anwendungen wurde eine FCCP-Stammlösung (100 µM in XF Analysemedium) in der Quellplatte der Substanzbibliothek manuell hergestellt. Die Bravo Plattform verdünnte die FCCP-Stammlösung (100 µM) direkt auf die Verdünnungsplatten. Danach wurden die Proben automatisch in die B-Ports einer XFe96 Kartusche geladen. Alle FCCP-Behandlungen wurden in Gegenwart von 1 µM Oligomycin durchgeführt. Die Bravo Plattform lud 20 µl Oligomycin-Injektionslösung (10 µM) in alle A-Ports und 25 µl Rotenon-/Antimycin-A-Lösung (je 5,0 µM) in alle C-Ports, um einen standardmäßigen XF Mito Stresstest (MST) durchzuführen. Diese FCCP-abhängige Dosis-Wirkungs-Analyse wurde an einem anderen Tag wiederholt (zwei Replikate).

Herstellung der Injektionslösung – Antimycin-A-Verdünnungsserie

Eine Stammlösung Antimycin A (AA, 50 mM, in DMSO, Sigma A8674-25) wurde mit XF Analysemedium auf 100 µM AA verdünnt. Die folgenden Verdünnungen wurden von der Bravo Plattform in eine Agilent 96-Well-Aufbewahrungsplatte (201276-100) hergestellt. Es wurden parallel acht unabhängige, identische AA Verdünnungsserien in die gleiche Mikroplatte durchgeführt. Jede Verdünnungsserie bestand aus einer zweifachen Verdünnung in zehn Stufen von links nach rechts. Die Injektionsport-Konzentrationen lagen damit zwischen 10 µM und 0,02 µM. Die Bravo Plattform lud die AA-Verdünnungen dann in die A-Ports der XF96 Cartridge. Es wurden drei unabhängige Analysen durchgeführt.

Schema des Decks



Abbildung 2: Bravo Deck Konfiguration und die für die Zellwaschung verwendeten Laborgeräte.

Schema des Decks



Abbildung 3: Bravo Deck Konfiguration und die für die Beladung der Injektionsports verwendeten Laborgeräte.

Schema des Decks



Abbildung 4: Bravo Deck Konfiguration und die für die Verdünnungsserie verwendeten Laborgeräte.

Screening der Substanzbibliothek nach mitochondrialen und glykolytischen Inhibitoren

Die Substanzbibliothek Selleck-Pfizer enthält 72 von Pfizer lizenzierten Verbindungen (Selleckchem.com, Bestell-Nr. L2400, Pfizer Licensed Compound Library), die auf mitochondriale und glykolytische Hemmwirkungen untersucht wurden. Für dieses kleine Screening wurde die Bravo Plattform eingesetzt für: 1) das Waschen der Zellen, 2) die 100fache Verdünnungen der Substanzbibliothek aus einer 96-Well-Quellplatte und 3) die Abgabe von 20 µl in die verdünnte Substanzlösungen in die A-Ports der XF96 Sensorkartusche. Die Seahorse XFe96 Analyse umfasste drei Ratenmessungen (OCR- und ECAR-Basalraten), gefolgt von der Injektion der Testsubstanzen (10 µM Endkonzentration) und neun weiteren Ratenmessungen. Die OCR- und ECAR-Werte der letzten Messung (Nummer 12) dienen zur Ermittlung der Hemmwirkung.

Drei XF Analysen wurden parallel durchgeführt. So entstanden Mikroplatten mit technischen Replikaten. Diese Methode wurde dreimal wiederholt, daher wurden insgesamt neun technische Replikate (d. h. neun einzelne Mikroplatten) hergestellt. Die Z'-Werte der Datenqualität wurden mit einem Antimycin A/Rotenon-Cocktail (AA/Rtn, 0,5 µM, positive Kontrolle der OCR-Inhibition), 2-Deoxyglucose (2-DG, 50 mM, positive Kontrolle der ECAR-Inhibition) und DMSO (0,1 % Endkonzentration, Lösungsmittelkontrolle ohne Wirkstoff) ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Bestimmte Probenvorbereitungsschritte kommen bei allen Seahorse XF Analysen mit Hoechst Zellkernfärbemittel (Thermo Scientific, PI62249) vor, unabhängig von der spezifischen Anwendung bzw. dem verwendeten Kit:

- Aussaat von Zellen in die XF96 Zellkultur-Mikroplatte
- Waschen von Zellen (Kulturmedium wird durch Analysemedium ersetzt)
- Herstellung von Substanzlösungen (Verdünnungen)
- Laden der Substanzen in die Ports der XF96 Sensorcartridge

Diese Ablaufschritte sind Routine, erfordern viele Pipettierschritte und sind mögliche Fehlerquellen für Analysen. Daher eignen sie sich gut für die Automatisierung.

In diesem Projekt wollten wir die Nützlichkeit einer Automatisierung mit der Bravo Plattform beurteilen. Dazu haben wir uns auf die Schritte b bis d der Probenvorbereitung von Lebendzellen auf Seahorse XFe96 Analysen nach der Aufzucht konzentriert. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass die Automatisierung der Zellaussaat mit der Bravo Plattform die Robustheit der Analyse verbessert ([Gestin et al.](#)). Die Bravo Plattform passt zwar in eine Sterilwerkbank für die Gewebeanzucht, diese Anordnung wurde jedoch in diesem Labor nicht gewählt. Daher wurde die Leistung der automatisierten Zellaussaat nicht beurteilt.

In Abbildung 5 ist ein anspruchsvoller Arbeitsablauf für die Seahorse XF Analyse dargestellt.



Abbildung 5: Allgemeiner Arbeitsablauf einer Seahorse XF Analyse. Die Probenvorbereitungsschritte, die mit der Bravo Plattform automatisiert wurden, sind grün dargestellt: Zellwaschung, Herstellung der Injektionslösungen und Beladung der Seahorse XFe96 Sensorkartuschen. Die insgesamt gesparte praktische Arbeitszeit betrug 20 bis 60 Minuten pro Platte.

Waschen der Zellen

Vor einer XF Analyse mit adhärennten Zellen wird das Kulturmedium mit XF Analysemedium ersetzt und die Zellen so „gewaschen“. Es wurden adhärennte HEK293-Zellen benutzt, die nur lose haften. So sollte validiert werden, dass ein automatisches System die Zellen mit gleichbleibender Leistung und ohne Beschädigung oder Verlust von Zellen waschen kann. Beim Waschen von Zellen können sich schwach haftende Zellen unter Umständen ablösen, z. B. wenn das Medium zu schnell abgegeben wird und/oder die Pipettenspitze die Monolage der Zellen berührt. Die Bravo Plattform wurde auf eine bestimmte Höhe über dem Boden des Wells programmiert, um ein Berühren der Zelllage zu vermeiden. Darüber hinaus wurde das Risiko einer Ablösung von Zellen von den XF96 Kulturplatten minimiert, indem die Aspirations- und die Abgaberaten von Analysemedium entsprechend programmiert wurden.

Zur Beurteilung der automatisierten Zellwaschung wurden im Rahmen einer XF Analyse die Basalraten der Atmung (Sauerstoff-Verbrauchsrate, OCR) und der Ansäuerung (H^+ -Produktion) (extrazelluläre Azidifizierungsrate, ECAR) der HEK293-Zellen bestimmt (Abbildung 6). Die Daten belegen, dass die Bravo Plattform das Waschen der Zellen einheitlich durchführt. In dem dargestellten Beispiel ändern sich die normalisierten Raten der verschiedenen Wells nach dem Waschen mit der Bravo Plattform nicht signifikant (Abbildung 6B). Darüber hinaus wurde die Analyse über drei Tage wiederholt, und die Daten zeigen übereinstimmende ECAR-Werte mit einem niedrigen Standardfehler für jeden Tag. Diese Daten belegen, dass der Monolayer der Zellen beim Waschen der Zellen mit der Bravo Plattform gut erhalten bleibt (Abbildung 6C). Mit der Bravo Plattform konnten auch Suspensions-Zellen, die kurz vor der Zellwaschung mit Cel-Tak an XF96 Zellkultur-Mikroplatten geheftet wurden, erfolgreich gewaschen werden (Daten nicht dargestellt).

Die Bravo Plattform minimiert die Wahrscheinlichkeit einer Beschädigung des Zellmonolayers (siehe Abbildung 1) durch Kontrolle der Höhe der Spitzen im Well und der Geschwindigkeit der Aspiration und Abgabe von Flüssigkeiten. Auf diese Weise wird ein besser übereinstimmendes Restvolumen in den Wells erzielt, und ein Abkratzen bzw. Ablösen von Zellen von der Oberfläche des Wells sowie die Bildung von Luftblasen werden verhindert. Darüber hinaus werden die Medien und die Zellplatte im Bravo Deck während der gesamten Zellwaschung bei konstant 37 °C gehalten. Dies minimiert Schwankungen der Temperatur von Zellen und Analysemedium und reduziert die Variabilität der Analyseergebnisse weiter.

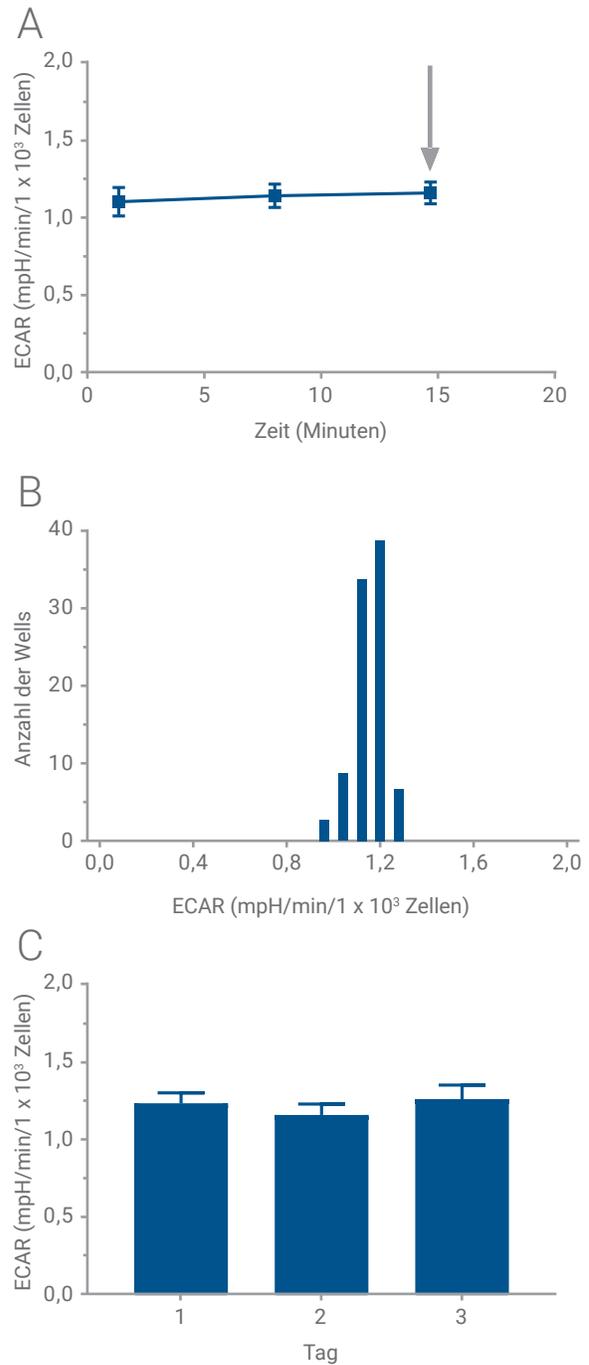


Abbildung 6: Test der automatisierten Zellwaschung gemäß Protokoll. In mit HEK293-Zellen besäten Platten wurden die Zellen von der Bravo Plattform automatisch gewaschen und einer Seahorse XF Analyse unterzogen. Für den Datenvergleich wurde der dritte Ratenmesswert benutzt. A) ECAR-Basalarate (keine Injektionen) – normalisierte XF Analyse. Der Pfeil weist auf den Messwert, der in den Tafeln B und C verwendet wird. B) Histogramm der ECAR-Werte (3. Messung) einer einzelnen XF96 Mikroplatte (n = 92 Wells). C) ECAR-Werte (3. Messung) von drei Replikatanalysen über drei Tage. Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n = 92).

Beladung der Injektionsports

Vor Seahorse XF Analysen müssen in der Regel Injektionsports der Sensorcartridge beladen werden. Die Injektionslösung sollte für einen Injektionsport-Typ (z. B. alle A-Injektionsports) identisch sein. So wird sichergestellt, dass die Lösung genau und präzise injiziert wird und daher in jedem Well die gleiche Wirkstoffkonzentration vorliegt. Darüber hinaus müssen die Ports vorsichtig beladen werden, damit keine Flüssigkeit durch den Boden des Injektionsports gedrückt wird.

Um nachzuweisen, dass die Bravo Plattform die Beladung mit Injektionslösungen genau und einheitlich durchführen kann, wurden drei aufeinander folgende Serien eines XF Zell Mito Stresstests (MST) durchgeführt. Es wurde die Maximalatmung analysiert (Abbildung 7A, Pfeil), da dieser Parameter empfindlich auf kleine Schwankungen der FCCP-Konzentration reagiert.

Abbildung 7 zeigt, dass die Bravo Plattform das Laden der Injektionslösungen in die Ports der Sensorkartusche genau und einheitlich durchführt. Die maximale Response, ein empfindlicher Messwert für kleine Schwankungen der FCCP-Konzentration, belegt fast identische Atmungsraten und -Responses auf MST-Injektionen (Abbildung 7B) in jedem Well. Darüber hinaus wurde die Analyse an einem anderen Tag wiederholt, und die Daten zeigen übereinstimmende OCR-Werte mit einem niedrigen Standardfehler für jeden Tag (Abbildung 7C). Insgesamt kann so gezeigt werden, dass die Bravo Plattform die Injektionslösung auf einheitliche Weise zum gewünschten Port überführt und so die Injektion des gesamten Volumens aus dem Port unterstützt.

Genaueres und übereinstimmendes Beladen der Ports ist für eine hohe Datenqualität sehr wichtig. Ein geschulter Anwender kann die Ports zwar genau und übereinstimmend von Hand beladen, es verbleiben jedoch mögliche Fehlerquellen, und die manuellen Fertigkeiten sind je nach Person deutlich unterschiedlich. Ein falsches Beladen der Ports hat unzureichende Injektionen (Injektionsfehler) oder ein Auslaufen von Substanzen aus dem Port vor der vorgesehenen Injektionszeit zur Folge. Ein teilweise injiziertes Volumen bzw. falsche Injektionsvolumen führen zu einer unerwünscht niedrigeren Konzentration im Well. Ein Auslaufen führt zu einer unerwarteten und unerwünschten, zu frühen analytischen Response. Gewöhnlich eignen sich solche Datenpunkte dann nicht mehr für die Auswertung. Die Bravo Plattform führt diesen Schritt bei jeder XF Analyse einheitlich aus und gibt genaue Volumen ab, ohne Luftblasen zu erzeugen oder übermäßigen Druck anzuwenden. Sie senkt außerdem das Risiko von Anwenderfehlern wie Kreuzkontamination von Pipettenspitzen und/oder Ports.

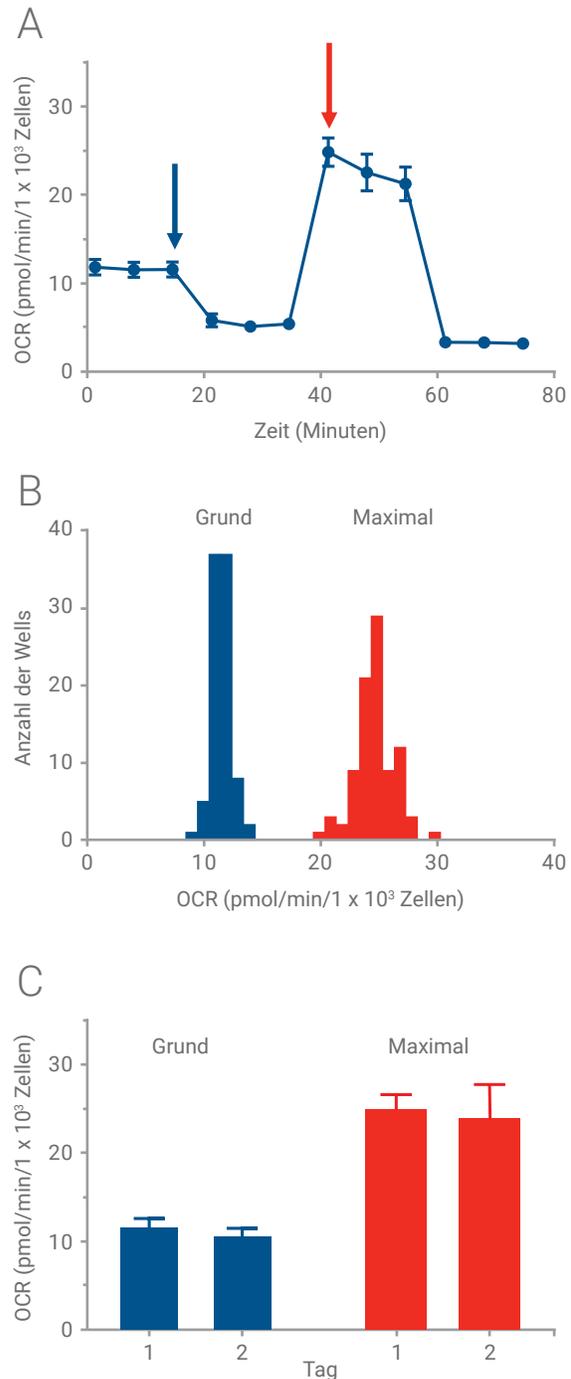


Abbildung 7: Beurteilung der automatisierten Beladung von Injektionsports. HepG2-Zellen wurden in XF96 Zellkultur-Mikroplatten ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum analysiert. Die MST-Injektionslösungen von Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A wurden hergestellt und in die XF Kartusche geladen. A) Ergebnisse des Zell Mito Stresstests. Die Pfeile zeigen auf die Basal- (blau) und die Maximalatmung (rot), die in den Tafeln B und C verwendet werden. B) Histogramm der normalisierten OCR-Basal- und Maximalwerte (3. und 7. Messung) einer einzelnen XF96 Mikroplatte (n = 92 Wells). C) Mittlere normalisierte OCR-Basal- und Maximalwerte (3. und 7. Messung) in zwei unabhängigen Analysen. Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n = 92).

Verdünnungsreihen und Dosis-Wirkungs-Analysen

Zur Charakterisierung einer Serie von Verbindungen bzw. Wirkstoffkandidaten werden häufig Dosis-Wirkungs-Analysen durchgeführt, um die Potenz zu bestimmen (z. B. IC_{50} oder EC_{50}). Die Bravo Plattform kann diesen Prozess vereinfachen, indem sie den praktischen Aufwand bei der Vorbereitung und Ausführung einer komplizierten Verdünnungsmatrix (und die damit verbundenen Risiken) reduziert.

Zum Nachweis der Leistungen der Bravo Plattform bei der Erzeugung von Dosis-Wirkungs-Matrizen dienten zwei Analysekonzepte: 1) technische Replikate auf einer Mikroplatte [Abbildungen 8 und 9] und 2) technische Replikate über mehrere Mikroplatten [Abbildungen 10 und 11].

Wie bereits erwähnt reagieren die zellulären Atmungsraten empfindlich auf kleine Schwankungen der FCCP-Konzentration, insbesondere bei Konzentrationen unter dem Maximum. Daher ist eine Dosis-Wirkungs-Analyse innerhalb eines engen FCCP-Konzentrationsbereichs ein robuster Test der Präzision der Bravo Plattform in diesem Zusammenhang.

Um technische Replikate auf einer Einzelplatte zu testen (Abbildung 8), wurde die Atmung der HepG2-Zellen in Reaktion auf 0,0 bis 2,0 μM FCCP (in 0,2- μM -Schritten) im Rahmen einer MST-Analyse gemessen. Die Maximalatmung (Abbildung 9A, Pfeil) steigt in diesem engen Bereich linear mit der FCCP-Konzentration an, erreicht die OCR-Maximalrate bei 1 μM FCCP und nimmt bei 2 μM FCCP leicht ab (Abbildung 9B). Jede Konzentration ist mit einer bestimmten Response und mit einem niedrigen Variationskoeffizienten verbunden. Dies belegt die Präzision der Bravo Plattform bei der Herstellung dieser spezifischen Verdünnungsreihe. Bei der Durchführung über mehrere Tage (N = 2) stimmen die Ergebnisse der FCCP-Response überein, und der Variationskoeffizient liegt bei allen Dosen < 10 % (Abbildung 9, Tafeln B und C).

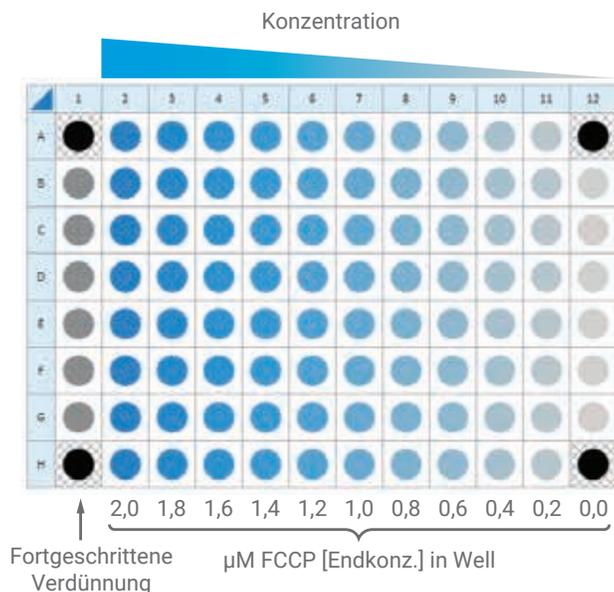
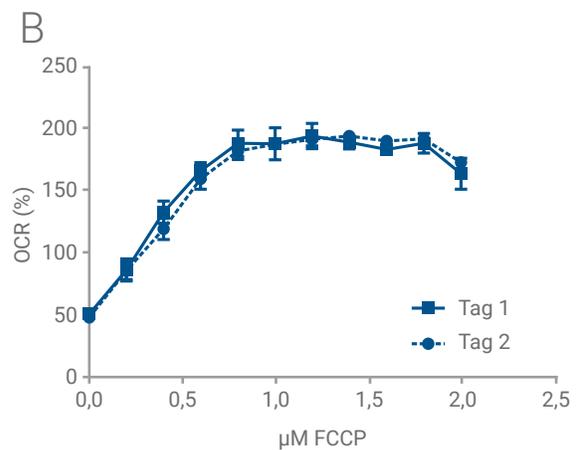
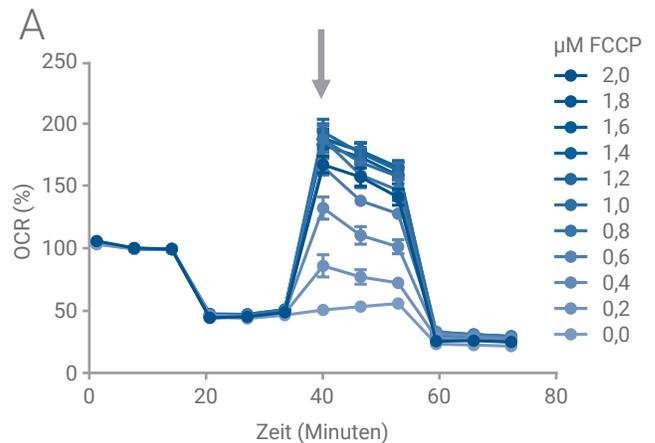


Abbildung 8: Plattenschema für den Test der technischen Replikate auf einer einzelnen Mikroplatte. Design der XF Dosis-Wirkungs-Analyse einer einzelnen Substanz (FCCP). Die Analyse besteht aus einer 10-stufigen Verdünnung auf FCCP-Endkonzentrationen zwischen 0,0 und 2,0 μM und acht technischen Replikaten pro Konzentration.



C

Tag 1			µM FCCP	Tag 2		
%OCR	Standardabweichung	%VK		%OCR	Standardabweichung	%VK
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

Abbildung 9: Technische Replikate auf einer Mikroplatte. Bei HepG2-Zellen wurde innerhalb eines engen FCCP-Konzentrationsbereichs (0 bis 2 μM in 0,2- μM -Schritten) eine FCCP-Titration durchgeführt. Die FCCP-Injektionslösungen wurden mit der Bravo Plattform hergestellt und in die Cartridge geladen. A. Kinetische Grafik der FCCP-Titration und relativen OCR-Response. B. Dosis-Wirkungs-Kurven von FCCP-Titrations aus zwei unabhängigen Experimenten, N = 8 (8 Zeilen x 1 Platte pro Datenkurve). C. Werte für % OCR, Standardabweichung und % VK aller getesteten Konzentrationen im Vergleich der beiden Tage.

Auch die Übereinstimmung der Wirkungsergebnisse von Replikaten auf mehreren Mikroplatten wurde getestet. Es wurden 10-stufige, zweifache Verdünnungsserien von AA (siehe Abbildung 10A) hergestellt. Die so erzeugten Lösungen wurden in die A-Ports der XF96 Sensorcartridge geladen. Die Bravo Plattform hat jede Verdünnungsserie AA1–AA8 unabhängig voneinander hergestellt, d. h. acht Wells AA-Stammlösung auf einer Quellplatte wurden mit acht unterschiedlichen Spitzen parallel verdünnt.

Es wurde eine XF Analyse durchgeführt: Es wurden drei Basalwerte aufgezeichnet, AA injiziert und anschließend drei weitere Ratenmessungen aufgezeichnet (Abbildung 10B). Die Response wurde als Verhältnis der Rate der 7. Messung zur Rate der 3. Messung (definitionsgemäß 100 %) berechnet und als % OCR gegen die AA-Konzentration (μM) aufgetragen, um die IC_{50} -Werte jeder Verdünnungsserie zu erhalten (Abbildung 10C). Die von der Bravo Plattform hergestellten AA-Proben lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Die mittleren IC_{50} -Werte verweisen auf eine gute Übereinstimmung sowohl bei Proben auf einer Mikroplatte als auch im Vergleich mehrerer Mikroplatten.

Insgesamt belegen diese Daten aus Dosis-Wirkungs-Modellanalysen, dass die Bravo Plattform komplexe Verdünnungsserien reproduzierbar herstellen kann. Dank dieser Reproduzierbarkeit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Replikat-Einzelplatte ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Daher können Daten aus Dosis-Wirkungs-Analysen von mehreren Replikat-Mikroplatten miteinander kombiniert werden. Wie bereits erwähnt kann eine manuelle Verdünnung zu kleinen Unterschieden beim überführten Volumen führen (die durch die gesamte Verdünnungsserie geschleppt werden) und das Risiko einer Kreuzkontamination von Substanzen erhöhen. Die Bravo Plattform stellt sicher, dass kleine Volumen genau und präzise überführt werden – ohne Kreuzkontamination von Proben. Schließlich kann die Bravo Plattform XF Kartuschenports in einem einzigen automatisierten Schritt beladen werden. Ein manueller Anwender braucht mehrere Schritte, die mit weiteren Variationen und Fehlern verbunden sein können.

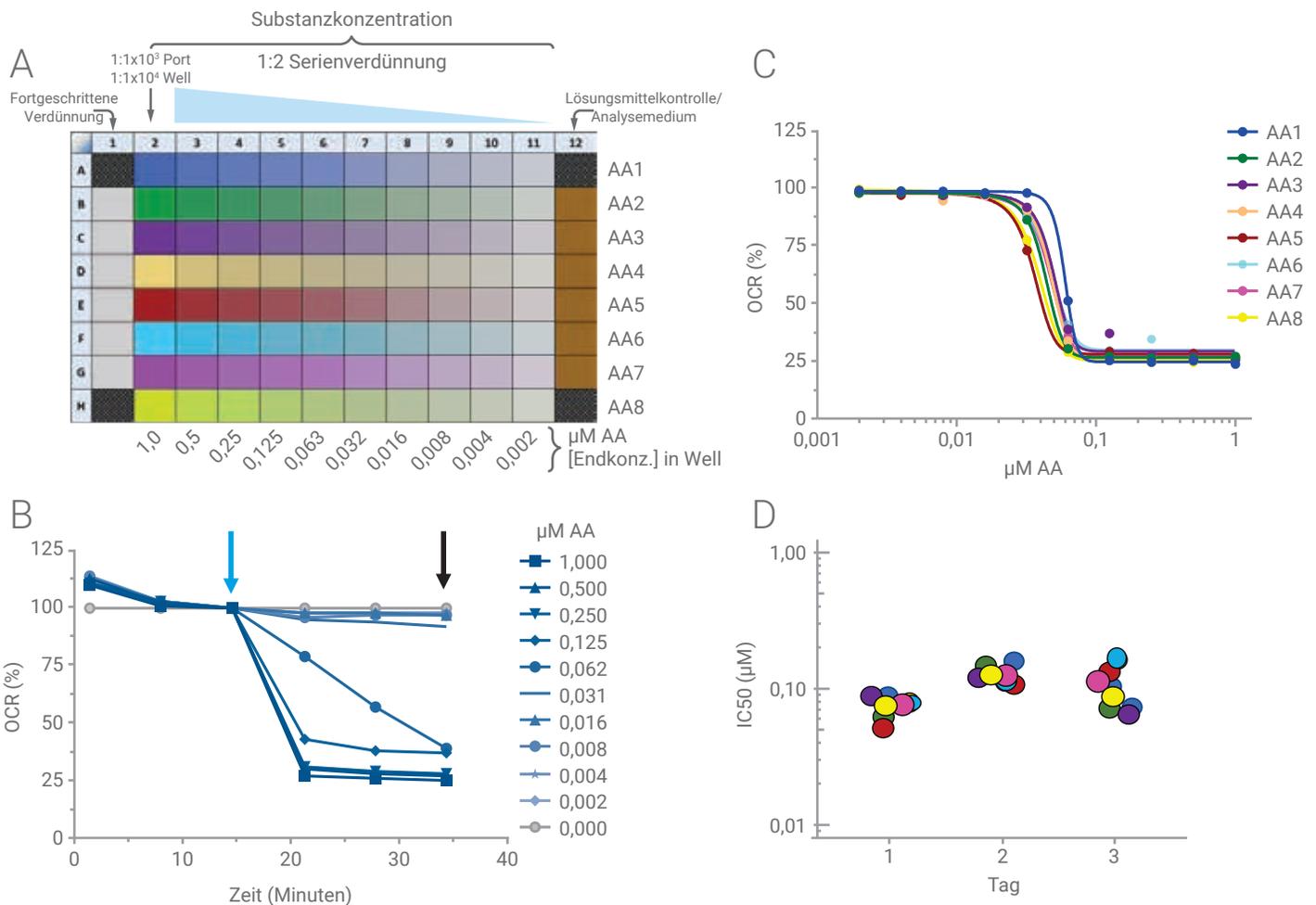


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Analyse A. Acht einzeln hergestellte AA-Verdünnungsserien wurden mit AA1, AA2 ... AA8 beschriftet. Jede einzelne Serie bestand aus einer 10-schrittigen, zweifachen Serienverdünnung. Die AA-Endkonzentrationen lagen zwischen 0,002 und 1,0 μM . Die Endkonzentration steht unter der Platte. B. Die sich ergebenden kinetischen XF Daten einer einzelnen Verdünnungsserie (AA1). C. Die sich ergebenden Dosis-Wirkungs-Kurven (AA1- AA8) von einer einzelnen Platte. D. Leistung der Antimycin-A-Titrations. Die IC_{50} -Werte wurden für jede Zeile des Analyseschemas in Tafel A berechnet. Jeder Punkt repräsentiert den IC_{50} -Wert einer Verdünnungsserie (= Zeile der Platte). Die Werte stimmen über die Zeilen und Tage hinweg jeweils überein.

Screening einer Substanzbibliothek – Analyse der akuten Inhibition

Zur Darstellung eines vollständig automatisierten Arbeitsablaufs wurde eine kleine Substanzbibliothek auf mitochondriale und glykolytische Inhibition untersucht. Das Screening auf eine mitochondriale und glykolytische Hemmwirkung erfolgte mit zweiundsiebzig Verbindungen aus der Selleck-Pfizer L2400 Library (Abbildung 11 oben). Die Bravo Plattform hat die Testsubstanzen auf eine Endkonzentration im Well von 10 µM verdünnt und die Testsubstanzen sowie die Kontrollen in die Injektionsports geladen.

Die Basalraten der HegP2-Zellen wurden mit dem Seahorse XFe96 Analyzer wie bereits beschrieben bestimmt. Anschließend wurden die Bibliothekssubstanzen injiziert und über eine Stunde die OCR- und ECAR-Responses aufgezeichnet (Abbildung 11, unten). Response war definiert als prozentuales Verhältnis der Rate nach 80 Minuten (blauer Pfeil) zur Rate kurz vor der Injektion der Substanz (orangefarbener Pfeil). Die Analyse wurde drei Mal am Tag über drei Tage wiederholt, um neun Replikat-Screeningplatten zu erhalten.

Z' ist ein Standardwert der Analyseleistung und wurde sowohl für die primären als auch die Replikatplatten bestimmt (Abbildung 12). Der AA/Rtn-Substanzcocktail diente als positive Kontrolle für die mitochondriale Inhibition. 2-Deoxyglucose (2-DG) diente als positive Kontrolle für die Inhibition der Glykolyse. Der durchschnittliche Z'-Wert für die Analyse der mitochondrialen Inhibition betrug 0,88 und für die Analyse der glykolytischen Inhibition 0,77. Dies ist ein Hinweis auf eine robust geplante und durchgeführte Analyse.

Die Responses auf die Substanzen der Substanzbibliothek wurden als relative OCR bzw. ECAR-Werte (in %) aufgetragen (Abbildung 13). Die kleinen Fehlerbalken, die für jede Substanz die Standardabweichung der Response repräsentieren, verweisen auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Inhibitionsanalysen im Platten- bzw. Tagesvergleich. Diese Reproduzierbarkeit und die Z'-Daten belegen, dass die Automatisierung mit der Bravo Liquid Handling Plattform und dem Seahorse XFe96 Analyzer eine robuste Methode für den Nachweis von mitochondrialen und glykolytischen Hemmern zur Verfügung stellt.

Das Analysedesign ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Zellen wurden vor und eine Stunde nach Substanzinjektion im gleichen Well gemessen. Auch bei einem Analysedesign, bei dem die Zellen vor der XF Analyse mit einer Verbindung behandelt werden (chronische Exposition), kann diese Plattform wertvolle Unterstützung leisten, um längerfristige kinetische Wirkungen der Behandlung zu beurteilen. In solchen Fällen kann die Bravo Plattform für die Abgabe der Verbindung direkt in die XF Zellkultur-Mikroplatte der betreffenden Zellen genutzt werden. Dies kann zu vorbestimmten Zeiten vor der XF Analyse erfolgen (z. B. 24 Stunden vorher).

	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	Keine Zellen
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	Am	2-DG	Keine Zellen
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	VEH	AA/Rot	Keine Zellen
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	VEH	AA/Rot	Keine Zellen
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	VEH	AA/Rot	BKG
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	VEH	AA/Rot	BKG

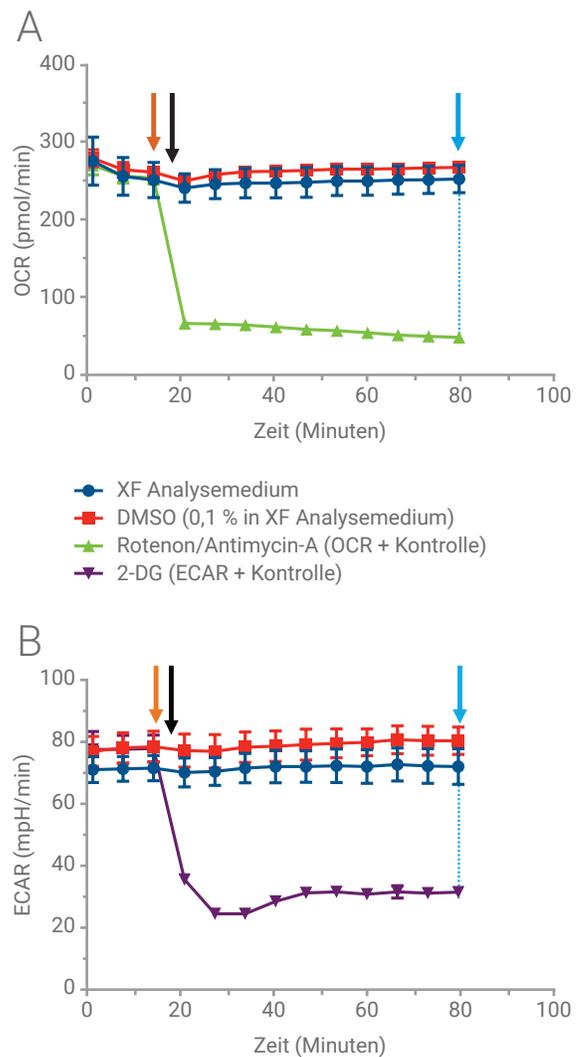


Abbildung 11: Screening einer Substanzbibliothek. Oben: Karte der XFe96 Platte. Die Substanzen sind nummeriert (1-72), AM: Analysemedium; VEH: DMSO-Kontrolle; 2-DG: positive ECAR-Kontrolle; Rtn/AA: positive OCR-Kontrolle. Unten: Darstellung der XF Analyse von OCR (A) und ECAR (B) mit Zeitpunkt der Injektion (schwarze Pfeile). Die Datenpunkte für die Berechnung der prozentualen Responses sind mit einem orangefarbenen (100%) und einem blauen Pfeil gekennzeichnet.

Tag-Platte	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'-Mittelwert	0,88	0,77

Zusammenfassung

In dieser Application Note werden die Methoden und die Leistung des automatisierten Liquid Handlings im Rahmen der Probenvorbereitung auf die XF Analyse beschrieben. Die Automatisierung der Zellwaschung, Herstellung der Injektionslösungen und Beladung der Cartridge-Ports mit der Bravo Plattform lieferte genaue und übereinstimmende Ergebnisse. Die Bravo Plattform hat außerdem weitere Pluspunkte: 1) weniger manuelle Fehler durch wiederholte manuelle Pipettierschritte, 2) bessere Übereinstimmung und Zuverlässigkeit der Datenqualität einer Mikroplatte oder im Vergleich mehrerer Mikroplatten und 3) reduzierter praktischer Aufwand bei der Vorbereitung der XF Analyse. Durch Automatisierung von wichtigen, bei XF Analysen anfallenden, manuellen Liquid-Handling-Schritten kann sowohl die Effizienz des XF Analysen-Arbeitsablaufs als auch die Qualität der Ergebnisdaten gesteigert werden.

Abbildung 12: Z'-Werte der Replikate im Rahmen von Analysen der akuten Inhibition. Z'-Werte der Kontrolle der OCR-Inhibition (Rotenon/AA) und der Kontrolle der ECAR-Inhibition (2-DG) von drei Replikatanalysen, die über drei Tage durchgeführt wurden (n = 9 pro Substanz).

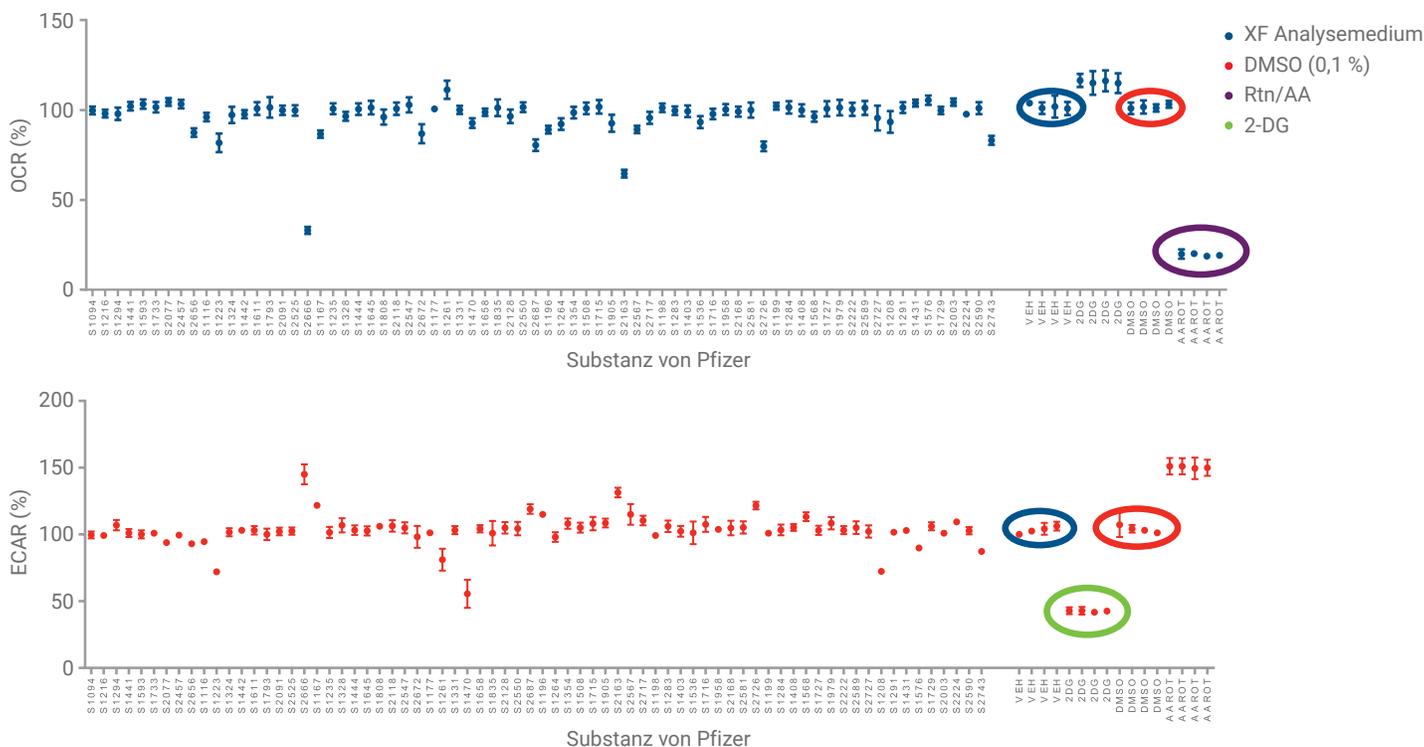


Abbildung 13: Beispielergebnis der Analyse der akuten Inhibition im Rahmen des Screenings mit der Substanzbibliothek Selleck-Pfizer L2400. Die mitochondrialen Responses (% OCR) sind oben und die glykolytischen Responses (% ECAR) unten dargestellt. Auch die Responses der positiven Kontrollen Rotenon/Antimycin-A (OCR-Hemmer, violett) und 2-DG (ECAR-Hemmer, grün) sind dargestellt. Die OCR- und ECAR-Responses auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) sind rot eingekreist.

Zusatzmaterial

Spezifikationen der Bravo Automated Liquid Handling Plattform für die Verwendung mit einem XFe96 und einem XF96 Analyzer (alle Höhen relativ zum Boden der angegebenen Platte oder zur Oberfläche)	
Aspirationshöhe in der Zellplatte	3 mm
Aspirationsgeschwindigkeit für:	
XF96 Zellplatte	„Spitzen mit festem Volumen 51–200 µl“
Reservoir (86 ml)	Standard
Aufbewahrungsplatten (96)	Standard
24-Säulen-Reservoir	Standard
Abgabehöhe für:	
Reservoir (86 ml)	2 mm
XF96 Cartridge	0,5 mm
Abgabegeschwindigkeit für:	
XF96 Zellplatte	„Langsame Waschung von Spitzen mit festem Volumen“
Reservoir (86 ml)	Standard
XF96 Cartridge	„384 Spitzen mit festem Volumen 10-50 µl“

Tabelle S1: Spezifikationen der Agilent Bravo Automated Liquid Handling Plattform für die Verwendung zusammen mit Agilent Seahorse XFe96 Analyzer.

www.agilent.com/chem/discoverxf

Ausschließlich zu Forschungszwecken.
Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Gedruckt in den USA, 4. März 2019
5994-0717DEE