

Massimizzare l'efficienza e le prestazioni delle analisi Seahorse XF con la piattaforma di gestione dei liquidi automatizzata Bravo

Autori

Lisa Winer

George W. Rogers

Sarah E. Burroughs

Brian P. Dranka

Agilent Technologies, USA

Abstract

È generalmente accettato che le fasi manuali di preparazione del campione possono influenzare la qualità dei dati delle analisi, specialmente nelle analisi basate su cellule. La preparazione manuale del campione (inclusa la pipettatura) può introdurre errori e può richiedere un tempo considerevole. Per evitare possibili errori e ridurre il tempo di preparazione manuale, viene proposta una gestione dei liquidi automatizzata per la preparazione del campione per le analisi Agilent Seahorse XF. Impiegata in un flusso di lavoro di analisi di routine, una piattaforma automatizzata di gestione dei liquidi Agilent Bravo (Bravo) ha dimostrato i seguenti vantaggi: 1) riduzione della variabilità dovuta agli errori manuali, 2) miglioramento dell'uniformità e della riproducibilità in una singola micropietra e tra micropietre, 3) riduzione del tempo di manipolazione per la preparazione di analisi XF. Complessivamente, l'automazione delle fasi di gestione dei liquidi di un'analisi Seahorse XF ha prodotto un miglioramento dell'efficienza del flusso di lavoro di preparazione del campione e dell'uniformità dei dati risultanti, specialmente nel contesto delle applicazioni di sviluppo di farmaci come la valutazione di routine dei composti e gli studi di risposta ai dosaggi.

Introduzione

Le analisi basate su cellule richiedono spesso numerose fasi di manipolazione di liquidi che possono influenzare la qualità dei dati. La mancanza di uniformità nella preparazione del campione può produrre una variabilità inaccettabile tra pozzetti, tra piastre o tra ripetizioni delle analisi. Queste fasi di pipettatura possono anche essere laboriose, specialmente quando si effettuano analisi multiple e/o con un grande numero di ripetizioni, come è spesso necessario nei progetti di sviluppo di farmaci.

Per esempio, anche se un operatore manuale esperto è in grado di effettuare il lavaggio delle cellule in modo uniforme, esiste comunque un maggiore rischio che il lavaggio manuale delle cellule provochi un danneggiamento del monostrato. Tale danneggiamento può essere il risultato di comuni errori, come quelli illustrati nella Figura 1. Questi includono il danneggiamento o la perdita di cellule dovuta al graffiamento della superficie monostrato (riquadro B), allo spostamento di cellule poco aderenti a causa di un'eccessiva forza nella pipettatura (riquadro C) e la rimozione di una quantità eccessiva di mezzi, che espone il monostrato all'aria e ne provoca il danneggiamento o il distacco (riquadro D). La pipettatura manuale comporta inoltre un possibile rischio di introdurre bolle che potrebbero danneggiare le cellule o avere effetto sul volume finale nel pozzetto.

Per risolvere questi problemi nelle analisi Seahorse XF, è possibile automatizzare diverse fasi fondamentali di pipettatura manuale con la piattaforma di gestione dei liquidi automatizzata Bravo. Effettuare queste fasi di gestione dei liquidi con la piattaforma Bravo costituisce per il ricercatore un valore aggiunto in termini di qualità dei dati e di riduzione del tempo di preparazione (manuale) delle analisi. Questi vantaggi consentono di incrementare la produttività grazie alla maggiore uniformità dei dati e al maggior tempo di "lavoro autonomo" del sistema durante le analisi XF.

In questa nota applicativa sono presentati metodi per automatizzare tre fasi fondamentali della gestione dei liquidi associate con la preparazione dell'analisi XFe96: lavaggio delle cellule, preparazione delle soluzioni per l'iniezione e caricamento di tali soluzioni nella cartuccia sensore XFe96. Sono quindi forniti esempi che illustrano ciascuna fase di automazione e includono l'analisi dei dati, nonché una stima del guadagno in termini di tempo di "lavoro autonomo" del sistema.

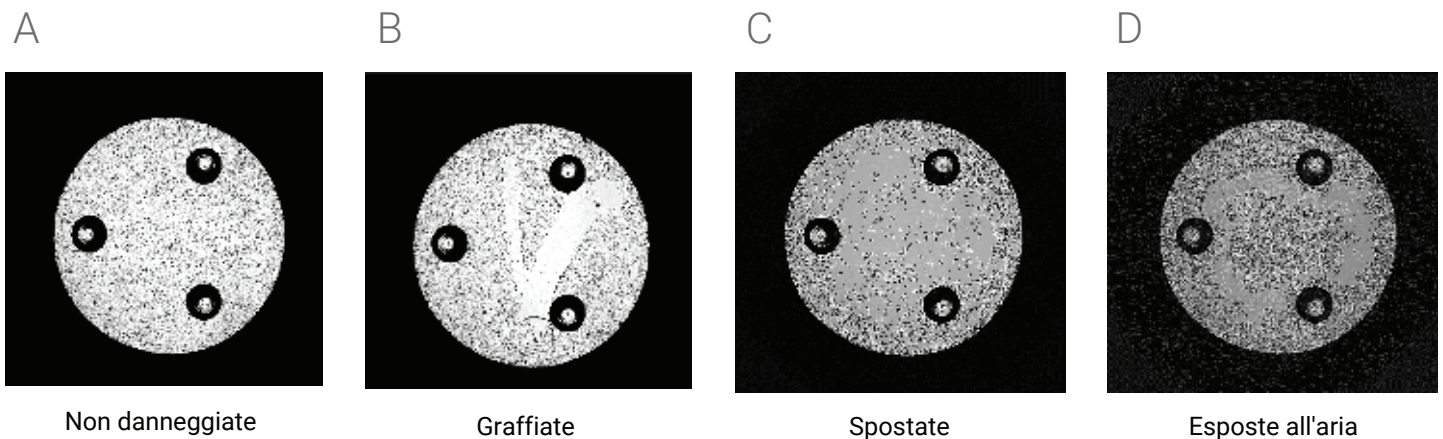


Figura 1. Immagini in campo chiaro di singoli pozzetti in una micropiastra XF96 che illustrano i danni subiti dal monostrato cellulare. A) Cellule non danneggiate. B) Presenza di graffi causati dalla punta della pipetta. C) Cellule spostate durante l'aspirazione o l'erogazione. D) Distaccamenti dovuti all'esposizione all'aria.

Materiali e metodi

Coltura cellulare

Cellule di HEK293 o HepG2 sono state seminate in micropiastre per coltura cellulare XFe96 a una densità rispettivamente di $3,0 \times 10^4$ o $1,5-2,0 \times 10^4$ cellule per pozzetto e sono state lasciate in coltura per una notte a 37°C con CO_2 al 5%. Le cellule di HEK293 sono state coltivate in DMEM (Gibco 11885084) integrato con FBS al 10% e 2 mM di GlutaMAX (Gibco 35050061), mentre le cellule di HepG2 in EMEM (ATTC 30-2003) integrato con FBS al 10%. Dopo 24 ore, le cellule sono state preparate per l'analisi di XF.

Normalizzazione

Il colorante nucleare Hoescht (Thermo Scientific, PI62249) è stato incluso nell'iniezione finale in tutte le analisi a una concentrazione di $20 \mu\text{g/mL}$ ($2 \mu\text{g/mL}$ nel pozzetto) e le micropiastre sono state sottoposte a imaging mediante BioTek Cytation 1. Sono stati contati i nuclei in ogni pozzetto e i dati del tasso di consumo dell'ossigeno (OCR) e del tasso di acidificazione extracellulare (ECAR) sono stati normalizzati in base a questi conteggi dei nuclei. Per una descrizione approfondita del sistema di imaging e normalizzazione Seahorse XF, fare riferimento al documento Normalization of Agilent Seahorse XF Data by In-situ Cell Counting Using a BioTek Cytation 5 <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7908EN.pdf>.

Configurazione della piattaforma Bravo e analisi delle prestazioni

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando una piattaforma Bravo configurata per l'uso con i prodotti di consumo associati all'analizzatore XFe96. Questa configurazione presenta blocchi riscaldati situati nelle posizioni quattro e sei del deck Bravo. I protocolli Bravo per ogni elemento del flusso di lavoro, inclusi i valori preimpostati di velocità e altezza di aspirazione ed erogazione (per maggiori dettagli, vedere la Tabella S1, Informazioni supplementari), sono stati implementati tramite il software Bravo Seahorse Assay Workbench. Sono stati utilizzati i materiali da laboratorio (recipienti e piastre per reagenti) per la piattaforma Bravo e i prodotti di consumo XFe96 forniti da Agilent specificati nella Tabella 1. Tutte le analisi di XF sono state effettuate utilizzando mezzi di analisi XF composti da mezzi DMEM con pH 7,4 Agilent Seahorse XF + glucosio 10 mM, piruvato 1 mM e glutammina 2 mM. Qualsiasi fase di pipettatura manuale è stata effettuata secondo i metodi e le prassi raccomandati per le analisi XF.

Materiali da laboratorio e prodotti di consumo Agilent	Codice	Quantità richiesta per un'analisi XFe96		
		Lavaggio cellule	Diluizione del composto	Caricamento cartuccia
Serbatoio Agilent per 24 colonne (polipropilene, 3,25 mL/colonna, geometria delle basi piramidale)	201296-100	-	-	1
Micropiastre di conservazione/reazione a 96 pozzetti (polipropilene a purezza ultra alta, pozzetti quadrati da 1 mL, fondi conici)	201276-100	-	2	-
Serbatoio Agilent (polipropilene, 86 mL, 96 pozzetti, geometria delle basi piramidale)	201254-100	2	1	-
Scatola di puntali Agilent, 250 μL , rack da 96°, compatibile con testina Bravo 96LT (piena)	19477-002	1	2	1
Scatola di puntali Agilent, 250 μL , rack da 96°, compatibile con testina Bravo 96LT (vuota)		-	1	1
FluxPak Agilent Seahorse XFe96	102416-100	1 piastra per cellule (piastra per cellule 96 Seahorse XFe96)	1 cartuccia XFe96 con piastra utilità (cartuccia 96 Seahorse XFe96 con piastra utilità, 384 porte)	
Mezzi DMEM con pH 7,4 Seahorse XF	103575-100	90 mL	40 mL	20 mL
Glucosio Seahorse XF (soluzione 1,0 M)	103577-100	0,9 mL	0,4 mL	0,2 mL
Piruvato Seahorse XF (soluzione 100 mM)	103578-100	0,9 mL	0,4 mL	0,2 mL
L-glutammina Seahorse XF (soluzione 200 mM)	103579-100	0,9 mL	0,4 mL	0,2 mL
Test di stress mitocondriale delle cellule XF (sorgente di oligomicina, FCCP e rotenone/antimicina A)	103015-100	-	1	1
Kit di analisi del tasso glicolitico (sorgente di 2-DG)	103344-100	-	1	1

Tabella 1. Materiali da laboratorio e prodotti di consumo Agilent richiesti per ogni fase di automazione.

Lavaggio cellule

Le cellule di HEK93 sono state utilizzate come modello di una linea cellulare debolmente aderente per dimostrare l'abilità di Bravo nell'effettuare il lavaggio delle cellule senza danneggiamento del monostrato o perdita di cellule (come descritto nella Figura 1). La configurazione del deck Bravo e i materiali da laboratorio utilizzati per il lavaggio delle cellule sono mostrati nella Figura 2. In breve, le cellule sono state lavate aspirando il mezzo di coltura e sostituendolo con il mezzo di analisi due volte, lasciando un volume finale nel pozzetto di 180 μL . Tre misurazioni basali sono state effettuate mediante un analizzatore Seahorse XFe96 e sottoposte a valutazione.

Caricamento delle porte di iniezione

Soluzioni stock dei reagenti per il test XF di stress mitocondriale delle cellule oligomicina, FCCP e antimicina A/rotenone sono state preparate ed erogate manualmente in un serbatoio per 24 colonne (Agilent, 201296-100). È stata quindi utilizzata la piattaforma Bravo per trasferire 20, 22 o 25 μL di queste soluzioni rispettivamente nelle porte A, B e C di una cartuccia sensore XFe96. La configurazione del deck Bravo per il caricamento della cartuccia sensore XFe96 è mostrata nella Figura 3. Tutte le fasi di lavaggio delle cellule per questa serie di analisi sono state effettuate mediante la piattaforma Bravo come descritto in precedenza.

Preparazione della soluzione di iniezione - Diluizione personalizzata dell'FCCP

Le diluizioni sono state effettuate in piastre di conservazione in polipropilene a 96 pozzetti (Agilent, 201276-100). La configurazione del deck Bravo per la diluizione dei composti e il caricamento della cartuccia sensore XFe96 è mostrata nella Figura 4. È stata effettuata una serie personalizzata di diluizioni di FCCP in 10 fasi, da 2 μM a 20 μM , in incrementi di 2 μM . È stato preparato manualmente uno stock comune di soluzione stock di FCCP 100 μM in mezzi di analisi XF nella piastra contenente la libreria. Diluizioni di FCCP sono state effettuate mediante la piattaforma Bravo nella piastra di diluizione direttamente dalla soluzione stock 100 μM , seguite dal caricamento automatizzato nelle porte "B" di una cartuccia XFe96. Tutti i trattamenti dell'FCCP sono stati effettuati in presenza di oligomicina 1 μM . La piattaforma Bravo è stata utilizzata per caricare 20 μL di una soluzione per iniezione di oligomicina 10 μM in tutte le porte A e 25 μL di una soluzione di rotenone/antimicina A (5,0 μM ciascuno) in tutte le porte C per completare il test di stress mitocondriale (MST) XF standard. Questa analisi di risposta al dosaggio di FCCP è stata ripetuta in un giorno differente (due replicati).

Preparazione della soluzione di iniezione - Diluizione seriale dell'antimicina A

È stata preparata una soluzione stock di antimicina A (AA, Sigma A8674-25) 100 μM a partire da una soluzione di DMSO 50 mM diluita con mezzi di analisi XF. Le successive diluizioni sono state effettuate mediante la piattaforma Bravo in una piastra di conservazione Agilent a 96 pozzetti (codice 201276-100). Otto serie di diluizioni di AA identiche e indipendenti sono state preparate in parallelo sulla stessa micropiastra. Ogni serie di diluizione consisteva in una doppia diluizione seriale in 10 fasi, da sinistra a destra, che davano come risultato concentrazioni nella porta di iniezione comprese tra 10 μM e 0,02 μM . Le diluizioni di AA sono state caricate nelle porte "A" della cartuccia XFe96 mediante la piattaforma Bravo. Sono state effettuate tre analisi indipendenti.

Disposizione del deck

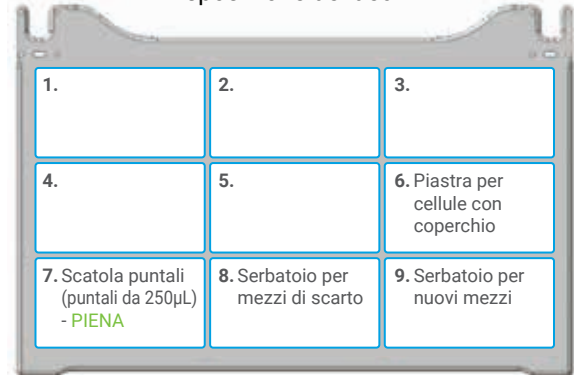


Figura 2. Configurazione del deck Bravo e materiali da laboratorio utilizzati per il lavaggio delle cellule.

Disposizione del deck

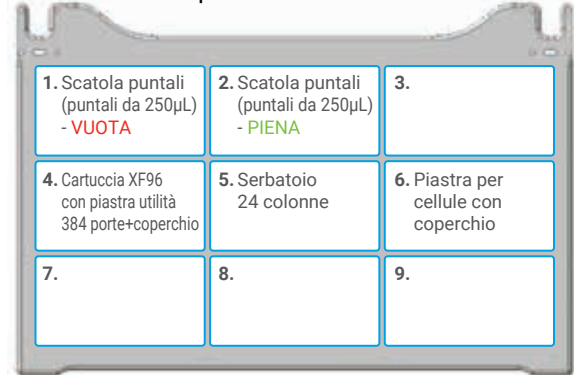


Figura 3. Configurazione del deck Bravo e materiali da laboratorio utilizzati per il caricamento delle porte di iniezione.

Disposizione del deck

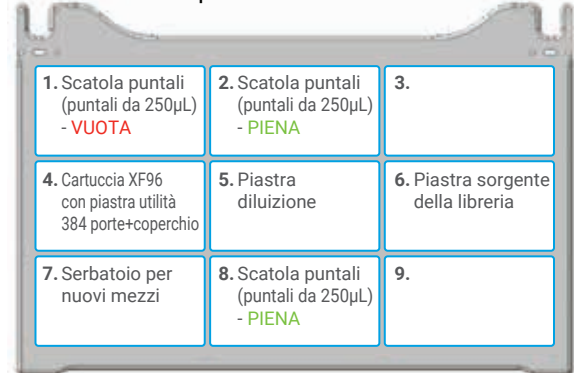


Figura 4. Configurazione del deck Bravo e materiali da laboratorio utilizzati per le serie di diluizione.

Screening della libreria dei composti per la ricerca di inibitori mitocondriali e glicolitici

72 composti in totale della libreria Selleck-Pfizer (Selleckchem.com, codice L2400, libreria dei composti con licenza di proprietà di Pfizer) sono stati sottoposti a screening per la ricerca di inibitori mitocondriali e glicolitici. Per questo piccolo screening, la piattaforma Bravo è stata utilizzata per 1) lavare le cellule, 2) effettuare 100 diluizioni della libreria dei composti da una piastra sorgente a 96 pozzetti e 3) erogare 20 µL delle soluzioni diluite dei composti nelle porte A della cartuccia sensore XF96. L'analisi Seahorse XFe96 consisteva in tre misurazioni dei tassi (OCR ed ECAR basali), seguita dall'iniezione dei composti di test (concentrazione finale 10 µM) e da altre nove misurazioni dei tassi. I valori di OCR ed ECAR ottenuti con la misurazione finale (numero 12) sono stati utilizzati per determinare l'attività inibitoria.

Tre analisi XF sono state effettuate in parallelo, generando replicati tecnici delle micropiastre. Questo metodo è stato ripetuto tre volte generando un totale di nove replicati tecnici (cioè nove singole micropiastre). Lo Z' per la qualità dei dati è stato generato utilizzando un cocktail di antimicina A/rotenone (AA/Rtn) 0,5 µM come controllo positivo dell'inibizione dell'OCR, 2-deossiglucosio (2-DG) 50 mM come controllo positivo dell'inibizione dell'ECAR e DMSO 0,1% (finale) come controllo del veicolo.

Risultati e discussione

Le analisi Seahorse XF con colorante nucleare Hoescht (Thermo Scientific, PI62249) presentano elementi di preparazione del campione in comune indipendentemente dalla specifica applicazione o dallo specifico kit utilizzati:

- semina delle cellule nella micropiastre di coltura cellulare XF96
- lavaggio delle cellule (sostituzione dei mezzi di coltura con i mezzi di analisi)
- preparazione dei composti (diluizioni)
- caricamento dei composti nelle porte della cartuccia sensore XF96

Queste fasi del flusso di lavoro sono di routine, comportano un lavoro di pipettatura non trascurabile e potrebbero potenzialmente introdurre errori nelle analisi; detto ciò, sono delle ottime candidate per l'automazione.

Questo progetto si è concentrato sulle fasi b-d per valutare l'utilità della piattaforma di automazione Bravo per effettuare la preparazione del campione di cellule vive successivamente alla coltura per le analisi Seahorse XFe96. È stato precedentemente dimostrato che l'automazione della semina di cellule mediante la piattaforma Bravo migliora l'affidabilità dell'analisi ([Gestin et al.](#)). Anche se la piattaforma Bravo può essere installata sotto a una cappa per la coltura dei tessuti, tale configurazione non è stata implementata in questo laboratorio, quindi le prestazioni della semina automatizzata delle cellule non sono state valutate.

Un flusso di lavoro di alto livello per un'analisi Seahorse XF è illustrato nella Figura 5.



Figura 5. Flusso di lavoro generale per le analisi Seahorse XF. Le fasi di preparazione del campione automatizzate mediante la piattaforma Bravo sono mostrate in verde: lavaggio delle cellule, preparazione delle soluzioni di iniezione e caricamento delle cartucce sensore XFe96. Il risparmio totale sul tempo di manipolazione è di 20-60 minuti per piastra.

Lavaggio delle cellule

Nelle analisi XF che usano cellule aderenti, le cellule vengono lavate prima dell'analisi XF per rimuovere i costituenti dei mezzi di coltura e fornire i mezzi di analisi XF delle cellule. Per verificare l'assunto che le cellule possono essere lavate mediante un sistema automatizzato in modo uniforme e senza danneggiamento o perdita di cellule, sono state utilizzate cellule debolmente aderenti HEK293. Durante il lavaggio delle cellule, esiste il rischio di spostare cellule debolmente aderenti erogando i mezzi in modo troppo rapido e/o toccando accidentalmente i monostrati cellulari con le punte delle pipette. La piattaforma Bravo è stata progettata in modo da mantenere una specifica altezza al di sopra del fondo dei pozzetti per evitare di toccare lo strato di cellule. Inoltre, l'aspirazione e l'erogazione dei mezzi di analisi è stata programmata con tassi che riducono al minimo il rischio di spostare le cellule dalle micropiastre di coltura cellulare XF96.

Per valutare il lavaggio automatizzato delle cellule, è stata effettuata un'analisi XF che misura la respirazione basale (tasso di consumo dell'ossigeno, OCR) e la produzione di acido (H^+) (tasso di acidificazione extracellulare, ECAR) utilizzando le cellule di HEK293 (Figura 6). I dati presentati mostrano che la piattaforma Bravo ha effettuato il lavaggio delle cellule in modo uniforme. Nell'esempio mostrato, i tassi normalizzati ottenuti usando la piattaforma Bravo per il lavaggio non mostravano differenze significative tra i pozzetti (Figura 6B). Inoltre, quando l'analisi è stata ripetuta per tre giorni, i valori di ECAR ottenuti dai dati sono uniformi e caratterizzati da un ridotto errore standard per ogni giorno. Questi dati indicano che l'integrità del monostrato cellulare è stata mantenuta in modo soddisfacente quando la piattaforma Bravo era utilizzata per il lavaggio delle cellule (Figura 6C). Inoltre, la piattaforma Bravo ha effettuato con successo il lavaggio di cellule in sospensione che avevano aderito alle micropiastre per coltura cellulare XF96 con Cel-Tak appena prima del processo di lavaggio delle cellule.

La piattaforma Bravo riduce al minimo il rischio di danneggiare il monostrato cellulare (come illustrato nella Figura 1) controllando sia l'altezza delle punte nel pozzetto sia la velocità di aspirazione o erogazione del liquido. Questo comporta una migliore uniformità nel volume residuo dei pozzetti, evita che le cellule vengano raschiate o spostate dalla superficie dei pozzetti ed evita la formazione di bolle d'aria. Inoltre, i mezzi e la piastra delle cellule nel deck Bravo sono mantenuti a 37 °C per l'intera durata del lavaggio delle cellule. In questo modo si minimizzano le variazioni di temperatura delle cellule e del mezzo di analisi, riducendo ulteriormente il rischio di variazioni aggiuntive nei risultati dell'analisi.

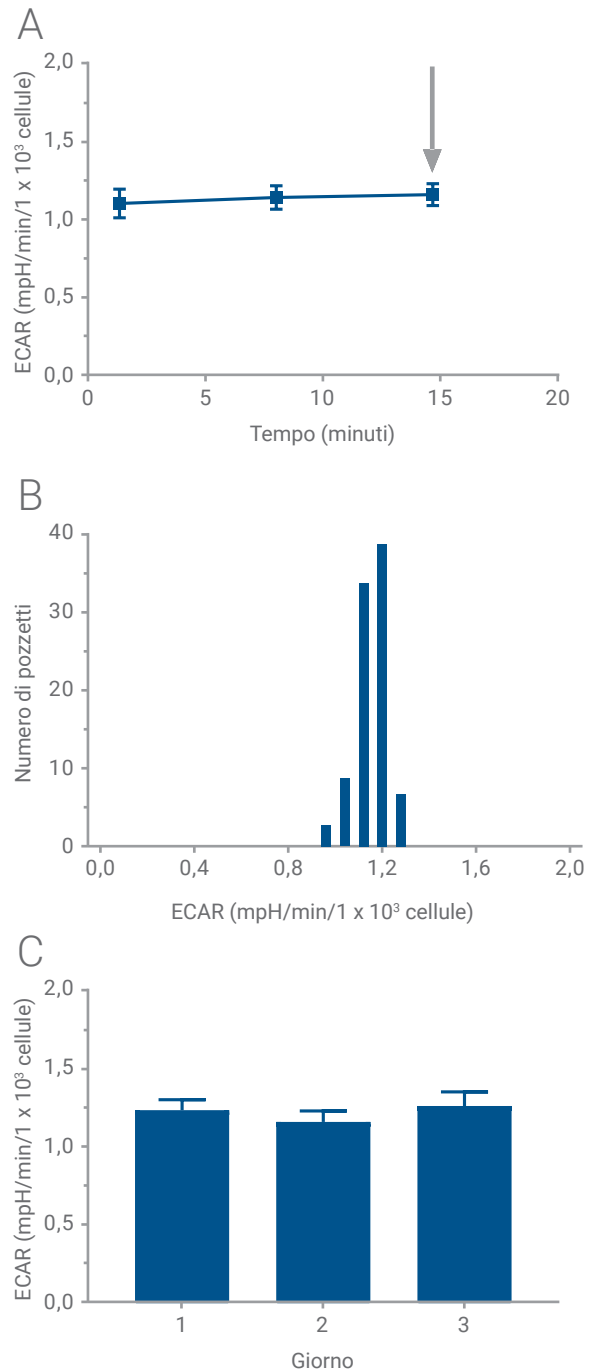


Figura 6. Test del protocollo di lavaggio automatizzato delle cellule. Le micropiastre sono state seminate con cellule di HEK293 e il lavaggio automatizzato delle cellule è stato effettuato mediante la piattaforma Bravo, dopo di che è stata effettuata l'analisi Seahorse XF. La terza misurazione dei tassi è stata utilizzata per il confronto dei dati. A) Analisi XF di ECAR basale (senza iniezione) con normalizzazione. La freccia indica i dati utilizzati nei grafici B e C. B) Istogramma dei valori di ECAR (misurazione 3) per una singola micropiastre XF96 (n = 92 pozzetti). C) valori di ECAR (misurazione 3) per tre analisi replicate effettuate in tre giorni. I dati sono presentati come il valore medio \pm la deviazione standard (n = 92).

Caricamento delle porte di iniezione

Le analisi Seahorse XF generalmente richiedono che una o più delle porte di iniezione della cartuccia sensore siano caricate prima dell'analisi. Il volume di soluzione di iniezione caricato dovrebbe essere identico in una certa serie di porte di iniezione (ad es. le porte di iniezione "A" ecc.) per garantire un'iniezione accurata e precisa della soluzione e quindi fornire la stessa concentrazione del farmaco risultante in ogni pozzetto. Inoltre, occorre prestare attenzione a caricare le porte delicatamente, in modo da non far fuoriuscire il liquido attraverso il fondo della porta di iniezione.

Per verificare che le soluzioni di iniezione vengano caricate in modo accurato e uniforme con una piattaforma Bravo, è stato effettuato un test XF di stress mitocondriale delle cellule (MST), costituito da tre iniezioni successive. È stata analizzata la respirazione massima (Figura 7A, freccia) in quanto questo parametro è sensibile a piccole variazioni della concentrazione di FCCP.

La Figura 7 mostra che la piattaforma Bravo ha effettuato il caricamento di soluzioni per iniezione nelle porte della cartuccia sensore in modo accurato e uniforme. La risposta massima, una misura sensibile a piccole variazioni della concentrazione di FCCP, ha mostrato tassi di respirazione e risposte a iniezioni di MST praticamente identici (Figure 7B) a livello di pozzetti. Infine, quando l'analisi è stata ripetuta in un giorno differente, i valori di OCR ottenuti dai dati sono risultati uniformi e caratterizzati da un ridotto errore standard per ogni giorno (Figura 7C). Complessivamente, questo dimostra che la piattaforma Bravo ha trasferito in modo uniforme la soluzione di iniezione alla porta desiderata in un modo che consente l'iniezione completa della soluzione dalla porta.

Un caricamento accurato e uniforme delle porte è essenziale per ottenere dati di alta qualità. Anche se un operatore manuale esperto è in grado di caricare le porte in modo accurato e uniforme, esiste comunque il rischio di errore e le abilità manuali variano grandemente da persona a persona. Un caricamento non corretto delle porte può avere come conseguenza un'iniezione insoddisfacente (errore di iniezione) o una perdita dei composti dalla porta prima che vengano iniettati. Un'iniezione parziale o un volume non corretto comportano una concentrazione inferiore a quella desiderata nel pozzetto. Una perdita provoca una risposta inaspettata nell'analisi in anticipo rispetto a quanto atteso, generalmente rendendo i relativi punti dati inadeguati per l'analisi.

La piattaforma Bravo esegue questa fase in modo uniforme per qualsiasi analisi XF erogando il volume con precisione, senza creare bolle d'aria o impiegare una pressione eccessiva. Inoltre riduce ulteriormente il rischio di errori da parte dell'utilizzatore come la contaminazione crociata delle punte delle pipette e/o delle porte.

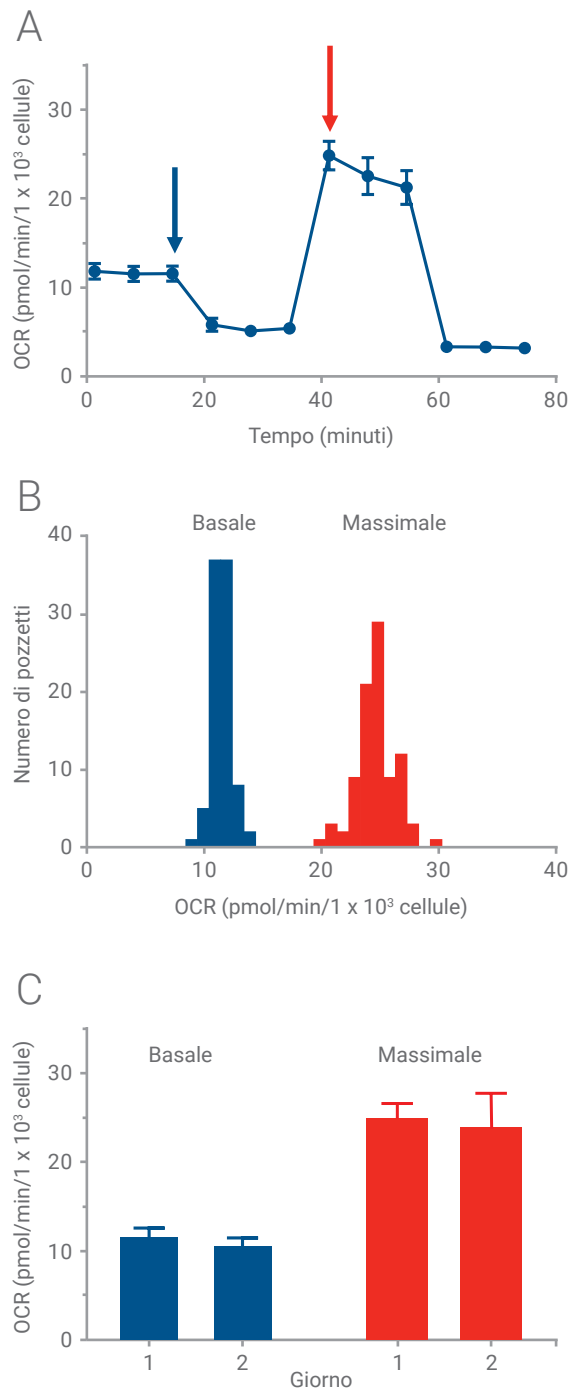


Figura 7. Valutazione del caricamento automatizzato delle porte di iniezione. Cellule di HepG2 sono state seminate in micropiastre di coltura cellulare XF96 e analizzate dopo 24 ore di coltura. Soluzioni di iniezione MST di oligomicina, FCCP e rotenone/antimicina A sono state preparate e caricate nella cartuccia XF. A) Risultati del test di stress mitocondriale delle cellule, le frecce indicano i dati di respirazione basale (in blu) e massima (in rosso) utilizzati nei grafici B e C. B) Istogramma dei valori normalizzati di OCR basale e massima (misurazioni 3 e 7) per una singola micropiastro XF96 (n = 92 pozzetti). C) Media normalizzata dei valori di OCR basale e massima (misurazioni 3 e 7) per due analisi indipendenti. I dati sono presentati come il valore medio +/- la deviazione standard (n = 92).

Diluzioni seriali e analisi di risposta ai dosaggi

Quando si caratterizza una serie di composti o di possibili farmaci, tipicamente si effettua un'analisi di risposta ai dosaggi per valutare la potenza (ad es. IC_{50} o EC_{50}). La piattaforma Bravo può facilitare questo processo riducendo al minimo il bisogno di manipolazione (e i rischi a esso associati) nella preparazione e nell'esecuzione di un'analisi con matrice di diluizione complessa.

Per testare la capacità della piattaforma Bravo di generare matrici di risposta ai dosaggi, sono stati utilizzati due tipi di analisi che consistevano in 1) replicati tecnici in una singola micropiastrella (Figure 8 e 9) e 2) replicati tecnici tra diverse micropiastre (Figure 10 e 11).

Come osservato in precedenza, i tassi di respirazione cellulare sono sensibili a piccole variazioni della concentrazione di FCCP, specialmente a concentrazioni inferiori a quelle massime. Pertanto, un'analisi di risposta ai dosaggi entro un ristretto intervallo di concentrazioni di FCCP è un test affidabile della precisione della piattaforma Bravo per la preparazione di analisi di risposta ai dosaggi.

Per testare replicati tecnici in una singola piastra (Figura 8), è stata misurata la respirazione di HepG2 in risposta a concentrazioni di FCCP tra 0,0 e 2,0 μM con incrementi di 0,2 μM mediante un'analisi MST. La respirazione massima (Figura 9A, freccia) aumenta linearmente in questo intervallo ristretto, raggiungendo il valore di OCR massimo per FCCP 1 μM , quindi diminuendo leggermente per FCCP 2 μM (Figura 9B). Ogni concentrazione provoca una risposta differente con bassi valori di CV (coefficiente di variazione percentuale), dimostrando la precisione della piattaforma Bravo nella preparazione di queste serie di diluizione personalizzate. Effettuando le analisi per più giorni (N=2), i dati risultanti mostrano risposte uniformi all'FCCP e i valori di CV per tutti i dosaggi sono < 10% (Figura 9B, C).

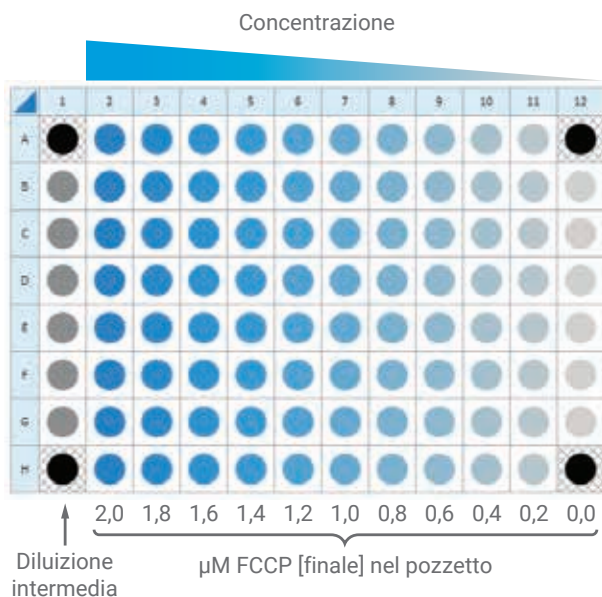
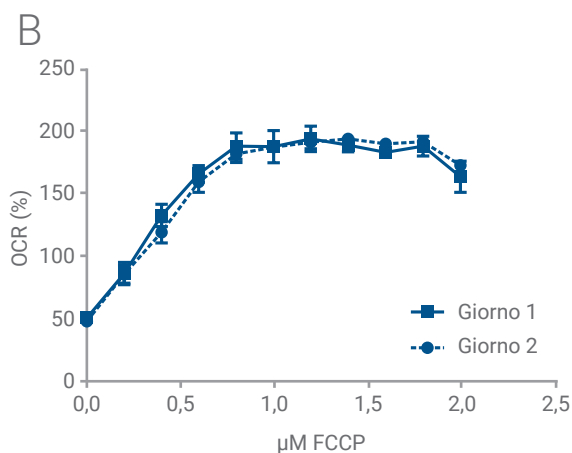
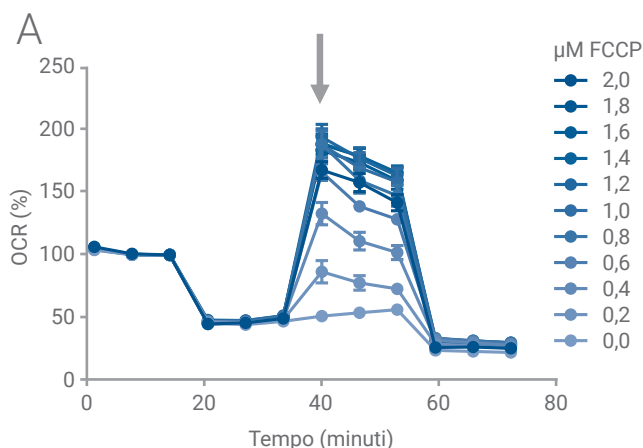


Figura 8. Disposizione nella piastra per il test di replicati tecnici in una singola micropiastrella. Tipo di analisi XF di risposta ai dosaggi che utilizza un unico composto (FCCP). L'analisi consiste in una diluizione in 10 fasi con concentrazioni di FCCP finali comprese tra 0,0 e 2,0 μM , con otto replicati tecnici per ogni concentrazione.



C

Giorno 1			μM FCCP	Giorno 2		
% OCR	DEV STD	% CV		% OCR	DEV STD	% 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

Figura 9. Replicati tecnici in una micropiastrella. Una titolazione di FCCP è stata effettuata su cellule di HepG2 in un ristretto intervallo di concentrazioni (tra 0 e 2 μM con incrementi di 0,2 μM). Le soluzioni di iniezione dell'FCCP sono state preparate e caricate nella cartuccia utilizzando la piattaforma Bravo. A. Grafico cinetico della titolazione dell'FCCP e della relativa risposta OCR. B. Curva di risposta ai dosaggi delle titolazioni dell'FCCP che rappresenta due esperimenti condotti indipendentemente, N=8 (8 file x 1 piastra per ogni tracciato di dati). C. Valori di OCR %, deviazione standard (DEV STD) e CV % per tutte le concentrazioni testate, confrontate in base al giorno.

È stata anche valutata l'uniformità delle determinazioni della potenza in caso di replicati generati in micropiastre differenti. La piattaforma Bravo è stata utilizzata per effettuare una doppia serie di diluizioni seriali in 10 fasi di AA (Figura 10A) e caricare le soluzioni risultanti nelle porte "A" della cartuccia sensore XF96. Ciascuna diluizione seriale è stata effettuata indipendentemente, cioè otto pozzetti di conservazione di AA di una piastra sorgente sono stati diluiti in parallelo utilizzando otto puntali differenti della piattaforma Bravo, ottenendo le serie di diluizione indipendenti AA1-AA8.

È stata effettuata un'analisi XF: sono state registrate tre misurazioni basali, l'AA è stata iniettata e quindi sono state registrate altre tre misurazioni dei tassi (Figura 10B). La risposta è stata calcolata come il rapporto tra il tasso nella misurazione sette e il tasso nella misurazione tre (definita come 100%) e riportata nel grafico come OCR % in funzione della concentrazione di AA in μM per generare i valori di IC_{50} per ogni serie di diluizione (Figura 10C). I risultati indicano che le risposte tra le singole serie di AA sono uniformi per i campioni preparati mediante la piattaforma Bravo, con i valori

IC_{50} medi in buon accordo sia per singola piastra/singolo giorno sia tra piastre e giorni differenti.

Complessivamente questi dati di analisi di risposta ai dosaggi illustrano che la piattaforma Bravo è in grado di preparare serie di diluizione complesse di composti in modo riproducibile. Questa riproducibilità aumenta la probabilità che una singola piastra replicata fornisca una risposta affidabile, consentendo pertanto di combinare i dati provenienti da analisi di risposta ai dosaggi di diverse micropiastre replicate. Come osservato in precedenza, la diluizione manuale può incrementare il rischio che si abbiano piccole differenze dei volumi di trasferimento (che possono propagarsi attraverso le fasi di diluizione), come anche la possibilità di contaminazione crociata dei composti. La piattaforma Bravo garantisce che piccoli volumi vengano trasferiti in modo accurato e preciso, senza contaminazione crociata dei campioni. Infine, la piattaforma Bravo è in grado di caricare le porte della cartuccia XF in un'unica fase automatizzata anziché nelle molteplici fasi necessarie a un operatore manuale, riducendo ulteriormente la variazione o l'errore associati con queste ultime.

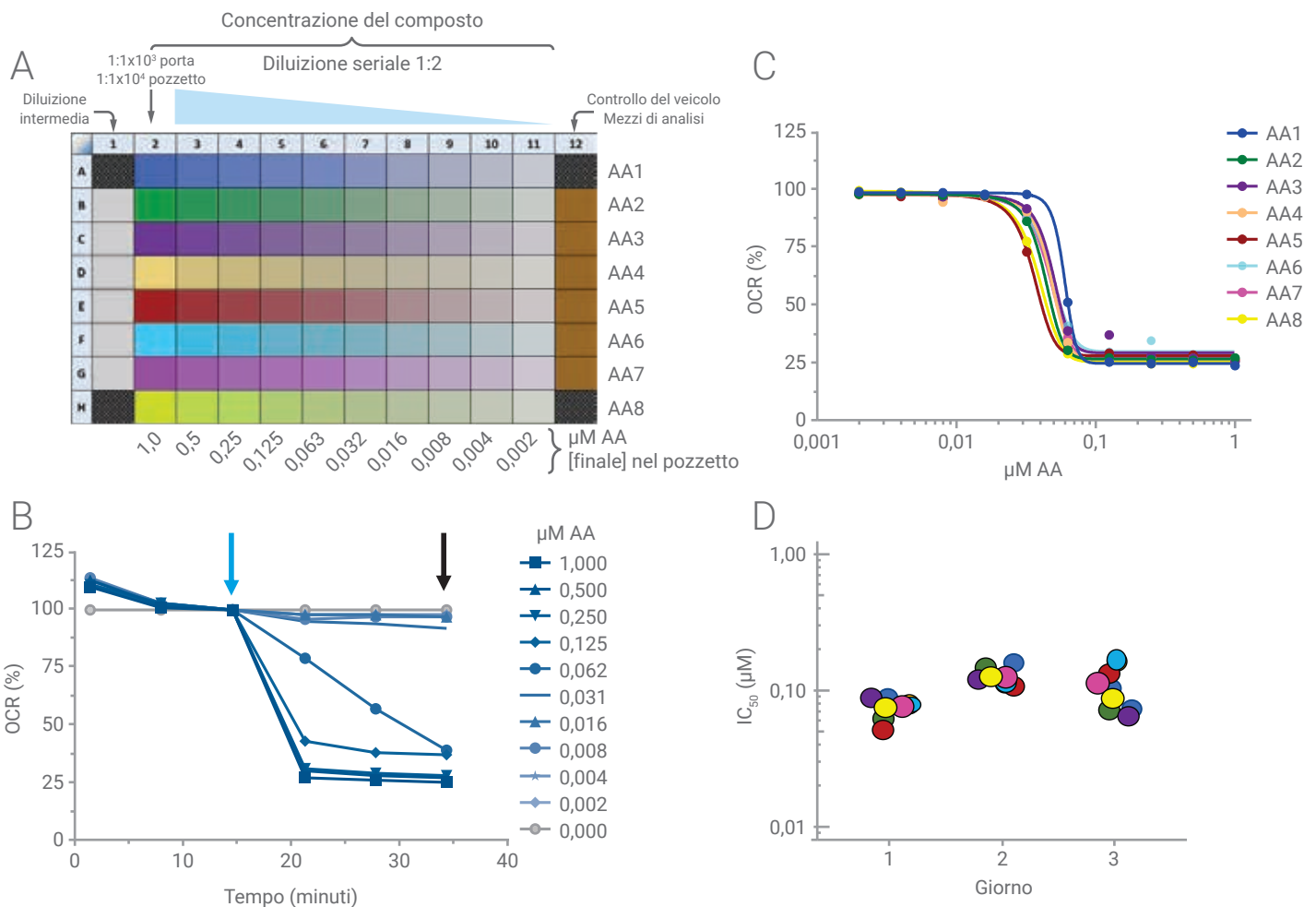


Figura 10. Analisi di risposta ai dosaggi dei composti. A. Otto serie di diluizione di AA preparate individualmente sono state etichettate AA1, AA2...AA8. Ognuna delle serie individuali è costituita da una doppia diluizione seriale in 10 fasi con concentrazioni finali di AA comprese tra 0,002 e 1,0 μM . La concentrazione finale è mostrata nella parte inferiore della piastra. B. Dati cinetici XF risultanti per una singola serie di diluizione (AA1). C. Curve di risposta ai dosaggi (AA1- AA8) risultanti per una singola piastra. D. Prestazioni della titolazione di antimicina A. I valori di IC_{50} sono stati calcolati per ogni riga secondo la disposizione di analisi mostrata nel riquadro A. Ogni punto rappresenta un valore di IC_{50} calcolato da una singola serie di diluizione (una riga della piastra). I valori sono uniformi tra riga e riga e tra giorno e giorno.

Screening della libreria dei composti - Analisi di inibizione acuta

È stato effettuato un piccolo screening dell'inibizione mitocondriale e glicolitica di una libreria di composti per illustrare l'intero flusso di lavoro automatizzato. Settantadue composti della libreria Selleck-Pfizer L2400 (Figure 11, in alto) sono stati sottoposti allo screening dell'attività inibitoria mitocondriale e glicolitica. La piattaforma Bravo ha diluito i composti da testare in modo tale che la concentrazione finale nei pozzetti fosse di 10 μM e ha caricato composti da testare e controlli nelle porte di iniezione.

Nell'analizzatore Seahorse XFe96, i tassi basali di HepG2 sono stati stabiliti come fatto in precedenza, quindi sono stati iniettati i composti della libreria e sono state registrate le risposte OCR ed ECAR acute per 1 ora (Figura 11, in basso). Le risposte sono state calcolate come il rapporto tra il tasso a 80 minuti (freccia blu) e il tasso appena prima dell'iniezione del composto (freccia arancione) e sono espresse come % del tasso prima dell'iniezione del composto. Questa analisi è stata ripetuta tre volte ogni giorno per tre giorni per generare tre piastre di screening replicate.

Il parametro Z' è una misura standard delle prestazioni di un'analisi e pertanto è stato calcolato per entrambi i risultati primari di ogni piastra replicata (Figura 12). Per l'inibizione mitocondriale, il cocktail di composti AA/Rtn è stato utilizzato come controllo positivo. Per l'inibizione della glicolisi, il controllo positivo è stato il 2-deossiglucosio (2-DG). Il valore medio di Z' era 0,88 per l'analisi dell'inibizione mitocondriale e 0,77 per l'analisi di inibizione della glicolisi, il che indica l'affidabilità del design e dell'esecuzione dell'analisi.

Per la libreria di composti, le risposte sono state riportate nel grafico come valori percentuali di OCR o ECAR (Figura 13). Come evidenziato dalle ridotte barre di errore che rappresentano la deviazione standard della risposta per ogni composto, le analisi di inibizione sono altamente riproducibili tra piastra e piastra e tra giorno e giorno. Questa riproducibilità e i dati di Z' indicano che utilizzare la piattaforma Bravo per l'automazione della gestione dei liquidi e la piattaforma Seahorse XFe96 costituisce un metodo affidabile per rilevare gli inibitori mitocondriali e glicolitici.

Nel design dell'analisi illustrata nella figura 11 le cellule sono state valutate nello stesso pozzetto prima dell'iniezione dei composti e 1 ora dopo. Questa piattaforma supporta anche la progettazione ed esecuzione di analisi in cui le cellule sono trattate con composti prima dell'analisi XF (esposizione cronica) in modo da indagare gli effetti cinetici a lungo termine dei trattamenti con composti. In questo caso, la piattaforma Bravo verrebbe utilizzata per l'erogazione di composti direttamente nelle micropiastre di coltura cellulare XF contenenti le cellule di interesse a tempi predefiniti prima dell'analisi XF (ad es. 24 ore).

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

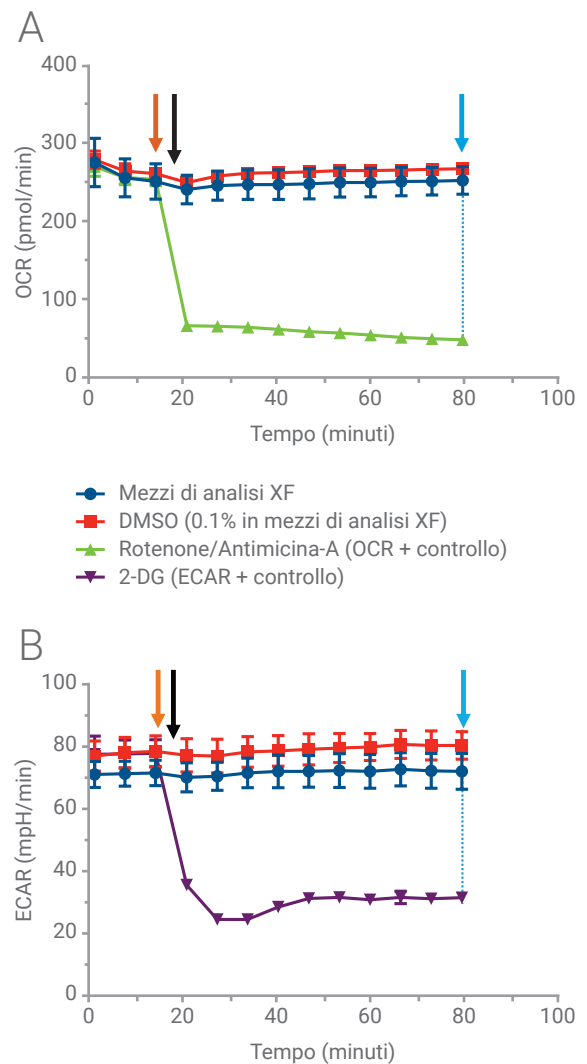


Figura 11. Screening della libreria dei composti. In alto: mappa della piastra XFe96. I composti sono etichettati con numeri (1-72): AM: mezzi di analisi; VEH: controllo DMSO; 2-DG: controllo positivo ECAR; Rtn/AA: Controllo positivo OCR. In basso: rappresentazioni dell'analisi XF per OCR (A) e ECAR (B) che mostrano il momento dell'iniezione (freccie nere). I punti dati utilizzati per il calcolo delle risposte % sono indicati rispettivamente con le freccie arancioni (100%) e blu.

Giorno-piastra	Z' OCR	Z' ECAR
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' MEDIO	0,88	0,77

Figura 12. Valori di Z' per analisi replicate di inibizione acuta. Valori di Z' per il controllo dell'inibizione dell'OCR (rotenone/AA) e il controllo dell'inibizione dell'ECAR (2-DG) per le analisi replicate effettuate in tre giorni (n = 9 per composto).

Riepilogo

In questa Nota applicativa sono illustrati metodi e prestazioni della gestione dei liquidi automatizzata per la preparazione del campione nelle analisi XF. L'impiego della piattaforma Bravo per automatizzare le fasi di lavaggio delle cellule, preparazione della soluzione di iniezione e caricamento delle porte della cartuccia sensore ha consentito di ottenere risultati accurati e uniformi. La piattaforma Bravo ha inoltre fornito i seguenti vantaggi: 1) riduzione degli errori manuali associati alla ripetizione delle fasi di pipettatura manuale, 2) aumento dell'uniformità e della affidabilità della qualità dei dati in una singola micropiastra e tra micropiastre, 3) riduzione del tempo di manipolazione per la preparazione di analisi XF. L'automazione di fasi manuali fondamentali della gestione dei liquidi di un'analisi XF risulta pertanto in una maggiore efficienza del flusso di lavoro delle analisi XF e inoltre in una migliore qualità dei dati prodotti.

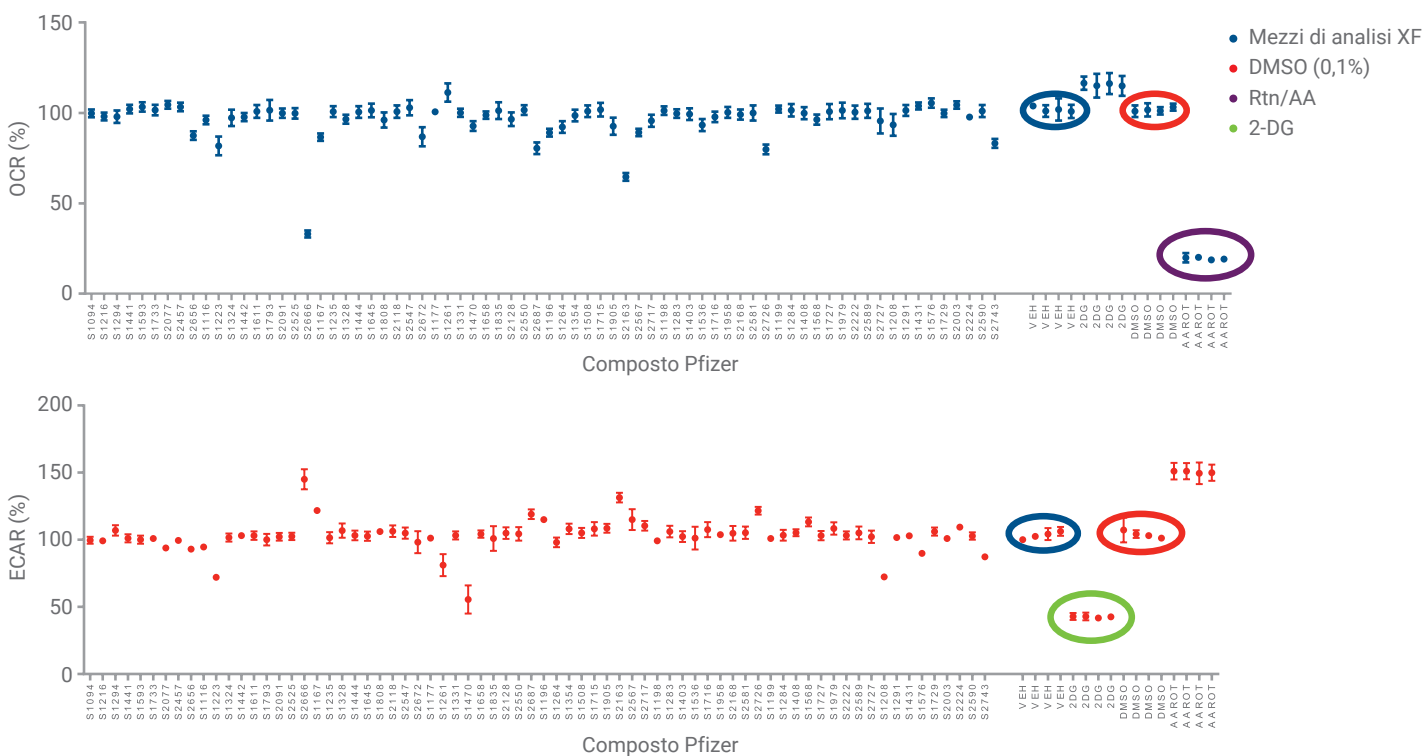


Figura 13. Esempi di risultati di analisi di inibizione acuta utilizzando la libreria di composti Selleck-Pfizer L2400. Le risposte per l'attività mitocondriale (OCR %) sono mostrate in alto e quelle per la glicolisi (ECAR %) in basso. Sono mostrate anche le risposte dei composti di controllo positivo rotenone/antimicina A (inibitore dell'OCR, in viola) e 2-DG (inibitore dell'ECAR, in verde). Le risposte di OCR ed ECAR al controllo del veicolo (DMSO 0,1%) sono cerchiare in rosso.

Materiale supplementare

Specifiche della piattaforma automatizzata di gestione dei liquidi Bravo per l'uso con gli analizzatori XFe96 e XF96 (tutte le altezze sono misurate rispetto al fondo della piastra specificata o alla superficie)	
Altezza per l'aspirazione nella piastra per cellule	3 mm
Velocità di aspirazione per:	
Piastra per cellule XF96	"51–200 µL, punta fissa"
Serbatoio (86 mL)	Predefinita
Piastra di conservazione (96)	Predefinita
Serbatoio 24 colonne	Predefinita
Altezza di erogazione per:	
Serbatoio (86 mL)	2 mm
Cartuccia XF96	0,5 mm
Velocità di erogazione per:	
Piastra per cellule XF96	"Lavaggio lento con punta fissa"
Serbatoio (86 mL)	Predefinita
Cartuccia XF96	"384 punte monouso 10–50 µL"

Tabella S1. Specifiche per la piattaforma automatizzata di gestione dei liquidi Bravo per l'uso con gli analizzatori Agilent Seahorse XFe96.

www.agilent.com/chem/discoverxf

Solo per scopi di ricerca.
Non utilizzabili per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.