

# Увеличение эффективности и результативности анализов Seahorse XF за счет использования автоматизированной платформы для работы с жидкостями Agilent Bravo

## Авторы

Lisa Winer (Лиза Уайнер)  
George W. Rogers  
(Джордж В. Роджерс)  
Sarah E. Burroughs  
(Сара И. Барроу)  
Brian P. Dranka  
(Брайан П. Дранка)  
Agilent Technologies, США

## Аннотация

Общеизвестно, что выполняемые вручную этапы пробоподготовки могут влиять на качество результатов анализов, в особенности тех из них, которые имеют дело с живыми клетками. Эти этапы, такие как, например, пипетирование жидкостей, занимают много времени и могут вносить погрешность в результаты. В данной работе демонстрируется, как использование автоматизированной платформы для работы с жидкостями Agilent Bravo помогает избежать потенциальных ошибок и снижает продолжительность ручной пробоподготовки. При выполнении рутинных анализов автоматизированная платформа для работы с жидкостями Agilent Bravo (называемая далее Bravo): 1) снижает разброс результатов из-за случайной погрешности лаборантов; 2) увеличивает стабильность и воспроизводимость результатов как в пределах одного микропланшета, так и между ними; 3) снижает затраты времени лаборантов на подготовку анализов XF. В работе показано, что в целом автоматизация этапов работы с жидкостями при проведении анализа Seahorse XF приводит к увеличению эффективности пробоподготовки и воспроизводимости результатов анализов, особенно в ходе разработки новых лекарственных препаратов, например при рутинной оценке активности соединений или исследовании влияния дозировки на эффективность препарата.

## Введение

Анализы, основанные на использовании живых клеток, зачастую включают в себя несколько этапов работы с жидкостями, которые могут влиять на качество получаемых данных. Ошибки в ходе пробоподготовки могут привести к неприемлемому разбросу результатов между отдельными лунками, планшетами и повторениями. Кроме того, пипетирование отнимает много времени, особенно если одновременно анализируется множество соединений в нескольких параллельных экспериментах, что нередко случается в ходе разработки новых лекарственных препаратов.

Например, несмотря на то что опытный лаборант способен выполнять промывку клеток с достаточной воспроизводимостью, существует повышенный риск того, что выполнение этой стадии вручную приведет к повреждению их монослоя. Такое повреждение является источником многих распространенных ошибок, некоторые из них проиллюстрированы на рис. 1. Эти повреждения включают в себя потерю клеток из-за царапин монослоя (рис. 1B), отслоение слабо закрепленных клеток слишком сильной струей жидкости из пипетки (рис. 1C) и отбор слишком большого объема среды, что приводит к оголению монослоя и гибели или отслоению клеток (рис. 1D). Пипетирование вручную также может привести к попаданию в среду пузырьков воздуха, которые могут повредить клетки и изменить конечный объем жидкости в лунке.

Автоматизированная платформа для работы с жидкостями Agilent Bravo позволяет автоматизировать ряд ключевых стадий пипетирования, обычно выполняемых вручную, и тем самым решить перечисленные выше проблемы при выполнении анализов Seahorse XF. Автоматизация этих стадий работы с жидкостями позволяет экспериментатору увеличить качество получаемых данных и снизить затраты времени на подготовку к анализу. Все это позволяет значительно увеличить производительность лаборатории, так как увеличивает воспроизводимость результатов и позволяет сотрудникам посвятить больше времени выполнению других работ.

В данных методических рекомендациях рассматриваются методы автоматизации трех ключевых этапов работы с жидкостями в ходе подготовки к анализу XFe96, этапов промывки клеток, подготовки растворов для инъекции и заполнения этими растворами патрона датчика XFe96. Выгоды от автоматизации каждого этапа демонстрируются на примере реальных результатов анализов, а также с помощью оценки высвободившегося рабочего времени лаборантов.

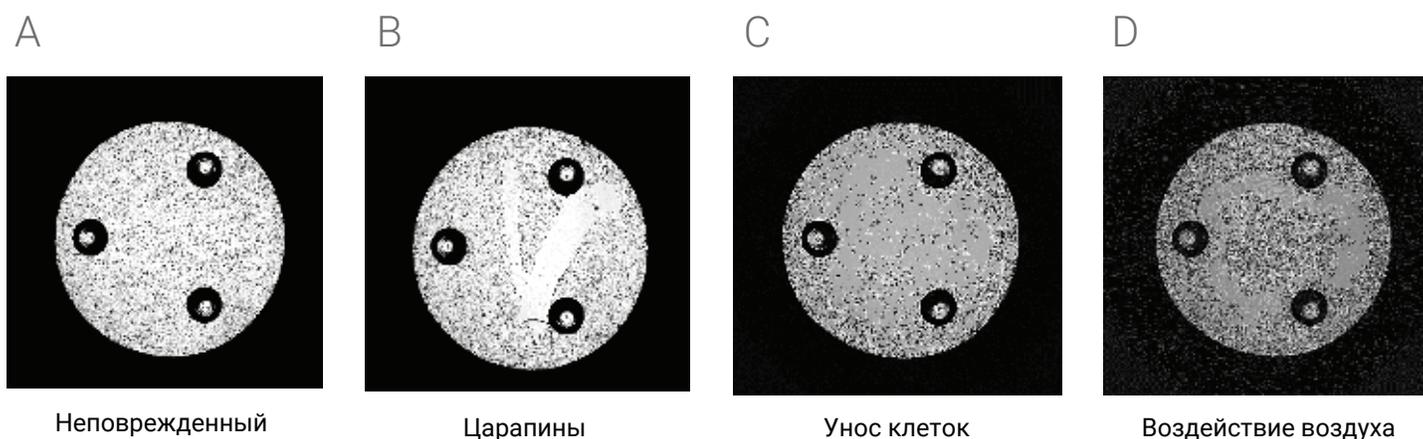


Рис. 1. Фотография в светлом поле одной лунки микропланшета XFe96 с иллюстрацией повреждения клеточного монослоя. А: неповрежденные клетки. В: царапины от наконечника пипетки. С: отслоение клеток в ходе отбора или дозирования жидкости. D: отслоение клеток от воздействия воздуха

## Вещества и методики

### Клеточная культура

Клеточные культуры линий HEK293 и HepG2 высевали на микропланшеты XF96 в количестве, соответственно,  $3,0 \times 10^4$  и  $1,5-2,0 \times 10^4$  клеток на лунку и инкубировали до следующего утра при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки HEK293 культивировали в среде DMEM (Gibco 11885084) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 2 ммоль GlutaMAX (Gibco 35050061), а клетки HepG2 – в среде EMEM (ATTC 30-2003) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. После инкубирования в течение 24 часов клетки готовили для анализа XF.

### Нормализация

Последняя инъекция всех анализов включала в себя цитологический краситель Хехст (Thermo Scientific, PI62249) в концентрации 20 мкг/мл (конечная концентрация в лунке 2 мкг/мл), после чего микропланшеты обрабатывали сканером BioTek Cytation 1. Для каждой лунки подсчитывали число ядер, а скорость потребления кислорода (OCR) и закисления внеклеточной среды (ECAR) нормализовывали относительно полученного значения. Подробное описание системы визуализации и нормализации Seahorse XF можно найти в работе 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>.

### Настройка и эксплуатационный тест платформы Bravo

Все анализы выполняли с помощью платформы Bravo в конфигурации для работы с расходными материалами анализатора XFe96. Эта конфигурация включает в себя два твердотельных термостата в позициях «четыре» и «шесть» на платформе Bravo. Протоколы Bravo для каждого из этапов, включающие в себя предварительно заданные высоты и скорости набора и дозирования жидкостей (подробнее см. табл. 1 в разделе дополнительной информации) задавали через программу Bravo Seahorse Assay Workbench. Исползованная посуда (емкости и планшеты для реагентов) для платформы Bravo и расходные материалы для XFe96 производства компании Agilent перечислены в табл. 1. Все анализы XF проводили в среде для анализа XF, состоящей из среды Agilent Seahorse XF DMEM со значением pH 7,4 с добавкой 10 ммоль глюкозы, 1 ммоль пирувата и 2 ммоль глутамина. Все пипетирование вручную выполняли в соответствии с методиками и практиками, рекомендованными для анализов XF.

Посуда и расходные материалы Agilent	Каталожный номер	Расход на один анализ XFe96		
		Промывка клеток	Разбавление	Заполнение патрона
24-ячеечный резервуар Agilent (полипропилен, 3,25 мл на ячейку, с пирамидальными углублениями)	201296-100	–	–	1
96-луночный накопительный/реакционный микропланшет Agilent (полипропилен сверхвысокой чистоты, квадратные лунки объемом 1 мл с коническим дном)	201276-100	–	2	–
Резервуар Agilent (полипропилен, 86 мл, 96 пирамидальных углублений)	201254-100	2	1	–
Коробка для наконечников Agilent, объем 250 мкл, 96 шт. на стойку, совместимая с головкой Bravo 96LT (полная)	19477-002	1	2	1
Коробка для наконечников Agilent, объем 250 мкл, 96 шт. на стойку, совместимая с головкой Bravo 96LT (пустая)		–	1	1
Agilent Seahorse XFe96 FluxPak	102416-100	1 планшет для живых клеток (96-луночный планшет для живых клеток Seahorse XF96)	1 патрон XFe96 со вспомогательным планшетом (96-луночный патрон Seahorse XF96 со вспомогательным планшетом, 384 порта)	
Питательная среда Seahorse XF DMEM pH 7,4	103575-100	90 мл	40 мл	20 мл
Глюкоза Seahorse XF (раствор 1,0 моль)	103577-100	0,9 мл	0,4 мл	0,2 мл
Пируват Seahorse XF (раствор 100 ммоль)	103578-100	0,9 мл	0,4 мл	0,2 мл
L-глутамин Seahorse XF (раствор 200 ммоль)	103579-100	0,9 мл	0,4 мл	0,2 мл
Тест на митохондриальное дыхание в стрессовых условиях Seahorse XF (источник олигомицина, карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP) и ротенона/антимитина А)	103015-100	–	1	1
Набор для определения скорости гликолиза (источник 2-дезоксид-глюкозы)	103344-100	–	1	1

Таблица. 1. Посуда и расходные материалы Agilent, необходимые для автоматизации каждого из этапов

## Промывка клеток

Клетки линии HEK93 использовали в качестве модели слабо закрепленной клеточной культуры для того, чтобы продемонстрировать способность платформы Bravo промывать клетки, не нанося повреждений монослою и не приводя к уносу клеток (см. примеры на рис. 1). Конфигурация платформы Bravo и посуда, использованные на этапе промывки клеток, показаны на рис. 2. Клетки промывали путем двукратного удаления питательной среды и замены ее средой для проведения анализа. После промывки объем жидкости в лунке составлял 180 мкл. После этого с помощью анализатора Seahorse XFe96 каждую лунку измеряли три раза, а полученные данные обрабатывали и анализировали.

## Заполнение входных портов

Исходные растворы олигомицина, FCCP и антимицина А/ротенона из набора теста на митохондриальное дыхание в стрессовых условиях Seahorse XF готовили вручную и заливали в 24-ячеечный резервуар (Agilent, кат. № 201296-100). Затем с помощью платформы Bravo по 20, 22 и 25 мкл из этих растворов переносили, соответственно, в порты А, В и С патрона датчика XFe96. Конфигурация платформы Bravo, использованная на этапе заполнения патрона XFe96, показана на рис. 3. В этой серии анализов все этапы промывки выполняли с помощью платформы Bravo, как описано выше.

## Подготовка раствора для инъекции: разведения исходного раствора FCCP

Разведения готовили в 96-луночных полипропиленовых накопительных планшетах (Agilent, кат. № 201276-100). Конфигурация платформы Bravo, использованная на этапе приготовления разведений и заполнения патрона XFe96, показана на рис. 4. Готовили серию из 10 разведений раствора FCCP с концентрацией от 2 до 20 мкмоль с шагом 2 мкмоль. Общий исходный раствор 100 мкмоль FCCP в среде для анализа XF готовили вручную на исходном планшете. Разведения раствора FCCP готовили на платформе Bravo непосредственно из этого исходного раствора на планшете для разведения и вводили в порты В патрона XFe96. Во всех случаях обработку раствором FCCP проводили в присутствии 1 мкмоль олигомицина. Для завершения стандартного теста на митохондриальное дыхание в стрессовых условиях Seahorse XF (MST) платформа Bravo вводила по 20 мкл 10 мкмоль раствора олигомицина в каждый из портов А и по 25 мкл раствора ротенона и антимицина А (5,0 мкмоль каждого) в каждый из портов С патрона XF. Исследование влияния дозировки FCCP повторяли на следующий день (два повторения).

## Подготовка раствора для инъекции: последовательное разведение раствора антимицина А

Исходный раствор 100 мкмоль антимицина А (антимицин А, Sigma A8674-25) готовили из раствора 50 ммоль антимицина А в ДМСО, который разбавляли до нужной концентрации средой для анализа XF. Последовательные разведения готовили на платформе Bravo, на 96-луночном накопительном планшете (Agilent, кат. № 201276-100). Параллельно на одном микропланшете готовили восемь серий последовательных разведений антимицина А. Каждая серия состояла из десяти последовательных двукратных разведений, слева направо, после введения которых во входной порт результирующая концентрация антимицина А составляла от 10 до 0,02 мкмоль. Разведения антимицина А вводили в порты А патрона XFe96 с помощью платформы Bravo. Выполняли три независимых анализа.

Схема платформы

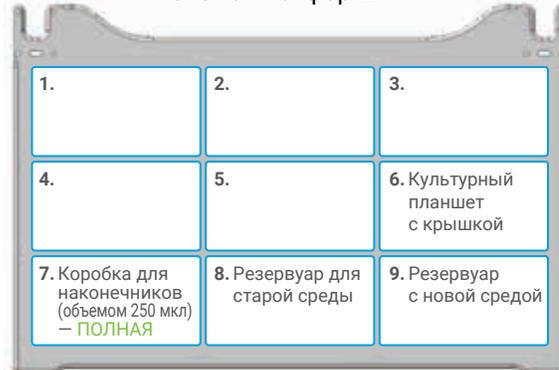


Рис. 2. Конфигурация платформы Bravo и посуда, использованные на этапе промывки клеток

Схема платформы



Рис. 3. Конфигурация платформы Bravo и посуда, использованные на этапе заполнения входных портов

Схема платформы



Рис. 4. Конфигурация платформы Bravo и посуда, использованные на этапе разведения

## Скрининг библиотечных соединений на ингибирование гликолиза и митохондриального дыхания

В ходе исследования проводили скрининг 72 соединений из библиотеки «Селлек-Пфайзер» (Selleckchem.com, кат. № 2400, библиотека лицензионных соединений компании «Пфайзер») на ингибирующую активность в отношении гликолиза и митохондриального дыхания. В этом небольшом по объему скрининге с помощью платформы Bravo выполняли: 1) промывку клеток, 2) стократное разведение растворов библиотечных соединений из 96-луночного исходного планшета, 3) введение 20 мкл разбавленного раствора библиотечных соединений в порты А патрона датчика XF96. Анализ Seahorse XFe96 состоял из трех измерений скоростей потребления кислорода (базальная OCR) и закисления внеклеточной среды (ECAR), за которыми следовало введение исследуемых соединений (до результирующей концентрации 10 мкмоль) и дополнительные девять измерений OCR и ECAR. Для определения ингибирующей активности использовали значения OCR и ECAR из последнего (№ 12) измерения.

Параллельно выполняли три анализа XF, каждый на отдельном планшете. Эту последовательность повторяли три раза, т. е. всего девять повторений (девять отдельных микропланшетов). Значения Z'-оценки для проверки качества данных получали с использованием раствора 0,5 мкмоль антимицина А и ротенона (AA/Rtn) в качестве положительной контрольной пробы ингибитора потребления кислорода, раствора 50 ммоль 2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG) в качестве положительной контрольной пробы ингибитора митохондриального дыхания и раствора 0,1% ДМСО (в конце) для контроля растворителя.

## Результаты и их обсуждение

Все анализы Seahorse XF с применением цитологического красителя Хехст (Thermo Scientific, PI62249) включают в себя общие этапы пробоподготовки, независимо от области применения или от используемого набора реагентов.

- Посев клеточной культуры на культурные микропланшеты XF96.
- Промывка клеток (для замены питательной среды на аналитическую).
- Подготовка рабочих растворов (разведение).
- Заполнение рабочими растворами патрона датчика XF96.

Все эти этапы подразумевают рутинную работу с большим количеством пипетирования и являются потенциальным источником ошибок в результатах анализа. Поэтому они являются хорошими кандидатами на автоматизацию.

В данной работе внимание фокусируется на этапах b – d с целью оценить пользу автоматической платформы Bravo на этапах пробоподготовки анализов Seahorse XFe96 после культивирования клеточной культуры. Ранее было показано, что автоматизация посева клеточной культуры с помощью платформы Bravo повышает надежность результатов анализа ([Gestin et al.](#)). Хотя размеры платформы Bravo позволяют установить ее в ламинарный шкаф, в нашей лаборатории такой платформы нет, поэтому влияние на результаты анализа автоматизации посева клеточной культуры не исследовалось.

Общее описание порядка выполнения анализа Seahorse XF приведено на рис. 5.



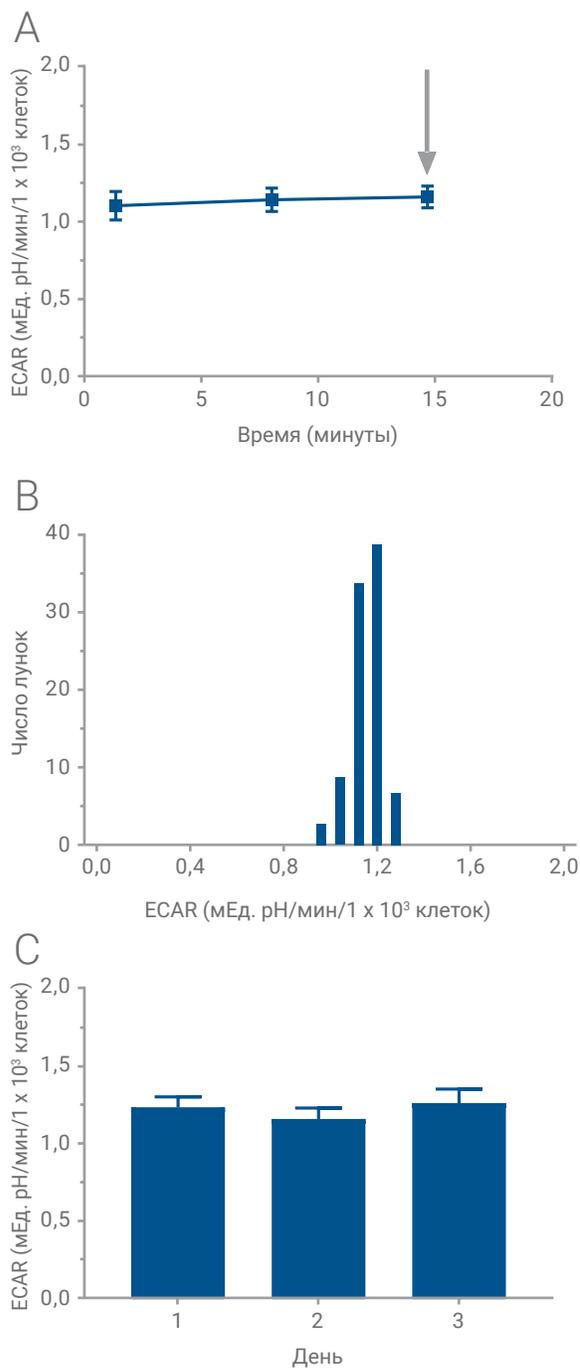
Рис. 5. Общий порядок выполнения анализа Seahorse XF. Этапы пробоподготовки, автоматизированные с помощью платформы Bravo, выделены зеленым цветом: промывка клеток, подготовка вводимых растворов и заполнение патронов датчика Seahorse XFe96. В общем, использование платформы Bravo позволило высвободить 20–60 минут рабочего времени лаборантов для каждого планшета

## Промывка клеток

В анализах XF, которые используют закрепленную клеточную культуру, клетки перед выполнением анализа промывают для того, чтобы убрать питательную среду и заменить ее на среду, в которой выполняется анализ. Чтобы показать, что автоматизированная система позволяет промывать клеточную культуру воспроизводимо, избегая гибели и потери клеток, проводили анализ с использованием слабозакрепленных клеток линии HEK293. При промывке клеточной культуры слабозакрепленные клетки могут отслаиваться как потоком слишком быстро дозируемой жидкости, так и при случайном касании наконечником пипетки клеточного монослоя. Для того чтобы платформа Bravo не касалась клеточного слоя, она была запрограммирована на определенную высоту над уровнем дна лунки. Кроме того, скорость отбора и дозирования аналитической среды устанавливали такой, чтобы снизить опасность отслаивания клеток на культурных микропланшетах XF96.

Для оценки эффективности автоматизированной промывки на клетках линии HEK293 проводили анализы XF, измеряющие базальное дыхание (скорость потребления кислорода или OCR) и скорость производства ионов водорода (скорость закисления внеклеточной среды, или ECAR) (рис. 6). Представленные данные демонстрируют, что платформа Bravo выполняла этап промывки клеток с достаточной воспроизводимостью. В приведенном примере нормализованные скорости, полученные в анализах с использованием платформы Bravo для промывки клеток, от лунки к лунке отличаются незначительно (рис. 6В). Данный анализ повторяли в течение трех дней, и для каждого дня данные демонстрируют воспроизводимые значения ECAR с малой стандартной погрешностью. Полученные данные указывают на то, что использование платформы Bravo для промывки клеток позволяет поддерживать высокую степень целостности клеточного монослоя (рис. 6С). Кроме того, платформа Bravo продемонстрировала способность успешно промывать суспензионную клеточную культуру, которая была закреплена на культурных микропланшетах XF96 с помощью Cel-Tak непосредственно перед промывкой (данные не приводятся).

Использование платформы Bravo минимизирует риск повредить клеточный монослой (как показано на рис. 1) за счет контроля высоты наконечника пипетки и скорости отбора и дозирования жидкости. Это позволяет добиться воспроизводимости значений остаточного объема жидкости в лунках, предотвращает соскабливание и отслаивание клеток от поверхности лунки, а также формирование пузырьков воздуха. Кроме того, платформа Bravo позволяет на всем протяжении промывки поддерживать растворы и культурные планшеты при температуре 37 °С. Это снижает изменения температуры, которым подвергаются клеточная культура и аналитическая среда, что снижает риск внести в результаты анализа дополнительную погрешность.



**Рис. 6.** Исследование протокола автоматизированной промывки клеток. Микропланшеты засеивали клеточной культурой линии HEK293, выполняли автоматизированную промывку клеток с помощью платформы Bravo, после которой проводили анализ Seahorse XF. Сравнивали данные третьего измерения скорости закисления внеклеточной среды. А: базовое нормализованное значение ECAR (без ввода испытуемого соединения) в анализе XF. Стрелка указывает на данные, использованные для построения графиков на рис. 6В и 6С. В: гистограмма значений ECAR (измерение 3) для одного микропланшета XF96 (n = 92 лунок). С: значения ECAR (измерение 3) для трех повторений анализа в течение трех дней. Данные представлены в виде «среднее +/- СКО (n = 92)»

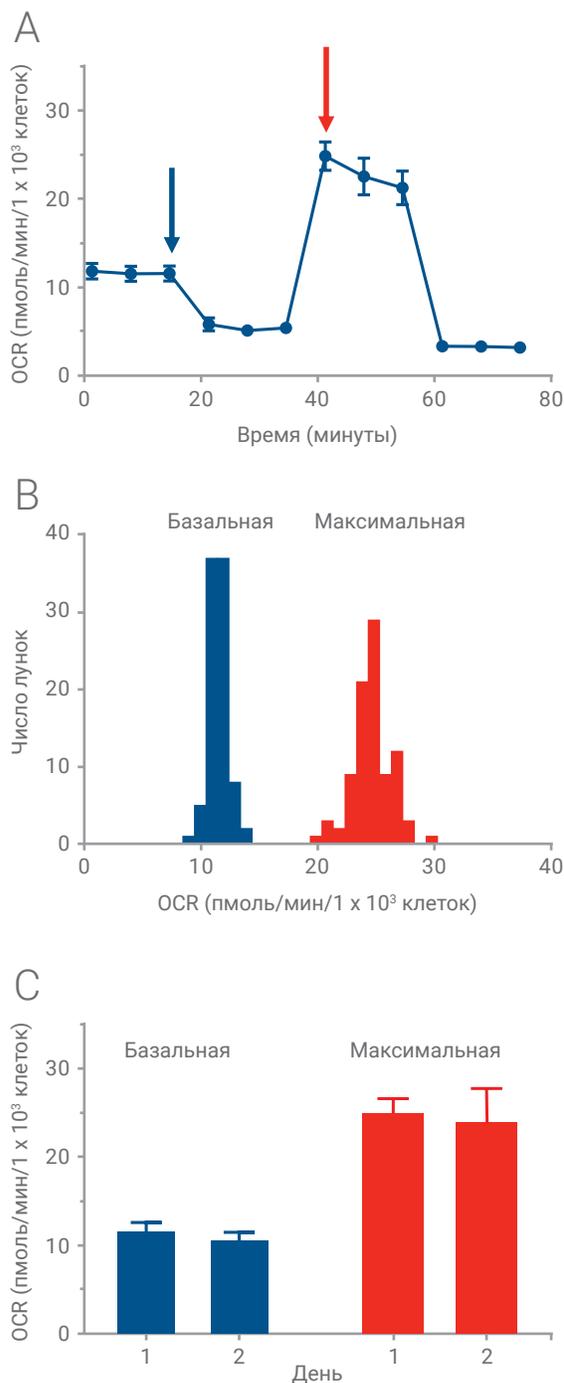
## Заполнение входных портов

При выполнении анализов Seahorse XF, как правило, один входной порт патрона датчика или более заполняют определенными растворами. Для того чтобы обеспечить точное дозирование раствора и тем самым получить одинаковую концентрацию определяемого соединения в каждой лунке, объем залитого в каждую серию входных портов (например, все порты А) раствора должен быть одинаковым. Кроме того, порты должны заполняться аккуратно — так, чтобы жидкость под давлением не просочилась сквозь дно порта.

Чтобы убедиться в том, что платформа Bravo позволяет точно и воспроизводимо заполнять входные порты патрона датчика соответствующими растворами, проводили тест XF на митохондриальное дыхание в стрессовых условиях (MST), включающий в себя три последовательные инъекции из входных портов. В качестве параметра, чувствительного к малым изменениям концентрации FCCP, измеряли максимальную скорость дыхания (рис. 7А, стрелка).

Рис. 7 доказывает, что платформа Bravo позволяет точно и воспроизводимо заполнять входные порты патрона датчика вводимыми растворами. Исследование продемонстрировало для всех лунок практически идентичные значения скорости дыхания и максимального отклика, чувствительного к незначительным колебаниям концентрации FCCP, на введение растворов теста MST (рис. 7В). Данный анализ был повторен на следующий день, и для каждого дня данные демонстрировали воспроизводимые значения OCR с малой стандартной погрешностью (рис. 7С). Все это позволяет утверждать, что платформа Bravo помогает воспроизводимо переносить нужный объем раствора во входной порт таким образом, чтобы обеспечить полноту ввода.

Точное и воспроизводимое заполнение входных портов — необходимое условие для получения высококачественных данных. Несмотря на то что опытный лаборант способен заполнить входные порты точно и воспроизводимо, практические навыки у разных людей отличаются, и это может послужить источником ошибок. Неправильное заполнение портов может привести к неполному вводу (или к тому, что раствор не будет введен) или к утечке раствора из порта до момента ввода. Ошибка дозирования или неполный перенос раствора из порта в лунку приведет к тому, что концентрация соответствующего соединения в лунке будет ниже заданной. Утечка же раствора приведет к тому, что отклик будет получен раньше, чем нужно, и это, как правило, делает данную точку непригодной для обработки данных. Платформа Bravo позволяет выполнять этот этап с нужной для любого из анализов XF воспроизводимостью, точно дозируя нужный объем раствора, не допуская образования пузырьков воздуха и не используя избыточного давления. Кроме того, платформа Bravo дополнительно снижает риск случайных ошибок оператора от перекрестного загрязнения наконечников и/или портов.



**Рис. 7.** Оценка эффективности автоматизированного заполнения входных портов. Культурные микропланшеты XF96 засеяли клеточной культурой линии HepG2, инкубировали в течение 24 часов и анализировали. Патроны XF заполняли подготовленными растворами олигомицина, FCCP и ротенона/антимитина А для теста на митохондриальное дыхание в стрессовых условиях (MST). А: результаты MST, стрелки обозначают базальную (голубая) и максимальную (красная) скорости дыхания, использованные для построения графиков на рис. 7В и 7С. В: гистограмма нормализованных значений базальной и максимальной скорости поглощения кислорода (измерения 3 и 7) для одного микропланшета XF96 (n = 92 лунок). С: средние нормализованные значения базальной и максимальной скоростей поглощения кислорода (измерения 3 и 7) для двух независимых анализов. Данные представлены в виде «среднее +/- СКО (n = 92)»

## Последовательное разведение и оценка влияния дозировки

При характеристике серии соединений или потенциальных действующих веществ для оценки биологической активности (например,  $IC_{50}$  или  $EC_{50}$ ), как правило, выполняют анализ на влияние дозировки на эффективность. Платформа Bravo помогает выполнить этот анализ, снижая затраты рабочего времени и связанную с работой вручную опасность ошибки при приготовлении сложных матриц разведений для анализа.

Для исследования способности платформы Bravo готовить матрицы разведений для анализа на влияние дозировки использовали две схемы проведения анализа: 1) несколько параллельных анализов на одном микропланшете (рис. 8 и 9) и 2) несколько параллельных анализов на разных микропланшетах (рис. 10 и 11).

Как было отмечено ранее, скорость клеточного дыхания реагирует на малейшие изменения концентрации FCCP, особенно при концентрациях, близких к предельным. Такое резкое влияние дозировки в узком диапазоне концентраций FCCP позволяет провести эксперимент, который дает возможность оценить точность платформы Bravo при подготовке разведений для анализа на влияние дозировки. Для проверки воспроизводимости параллельных анализов на одном планшете (рис. 8) с помощью MST измеряли скорость дыхания клеток линии HepG2 в присутствии FCCP в концентрации от 0,0 до 2,0 мкмоль с шагом 0,2 мкмоль. Максимальная скорость дыхания (рис. 9А, стрелка) увеличивается линейно в узком диапазоне концентраций FCCP, достигая максимума при концентрации 1,0 мкмоль и немного снижаясь при концентрации 2,0 мкмоль (рис. 9В). Для каждой концентрации был зафиксирован отчетливый отклик с низким разбросом, что демонстрирует точность платформы Bravo при приготовлении серий разведений. Анализы, проведенные с различием в несколько дней (N = 2), демонстрируют воспроизводимость отклика на концентрацию FCCP с относительным стандартным отклонением для всех доз ниже 10% (рис. 9В и С).

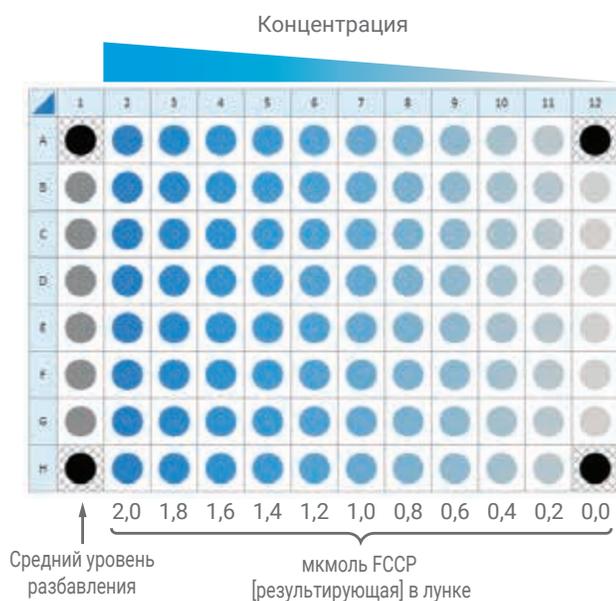
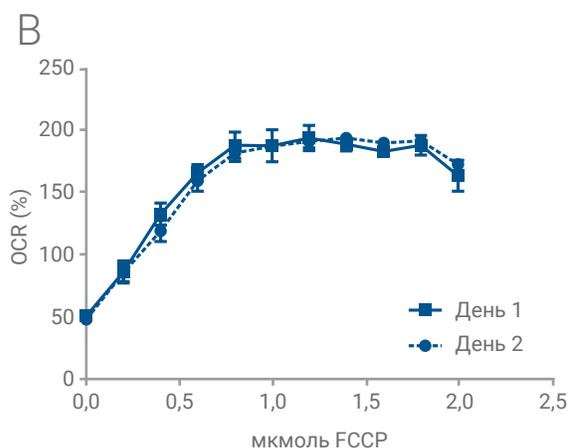
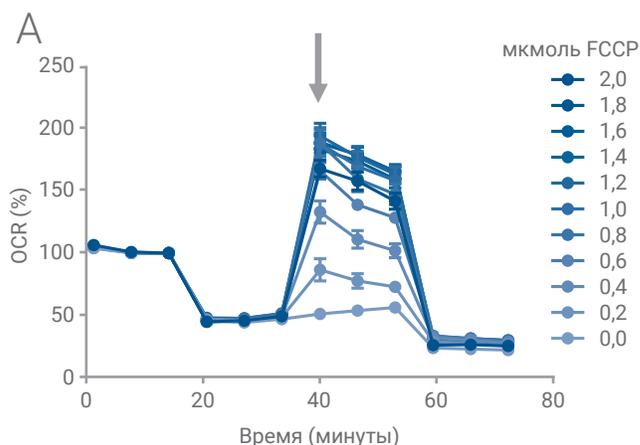


Рис. 8. Схема использования планшета при выполнении параллельных анализов на одном планшете. Схема анализа XF влияния дозировки одного соединения (FCCP). Анализ включал в себя десять разведений FCCP с результирующей концентрацией от 0,0 до 2,0 мкмоль, с восемью параллельными опытами для каждой концентрации



С

День 1			мкмоль/л FCCP	День 2		
OCR (%)	СКО	ОСО (%)		OCR (%)	СКО	ОСО (%)
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

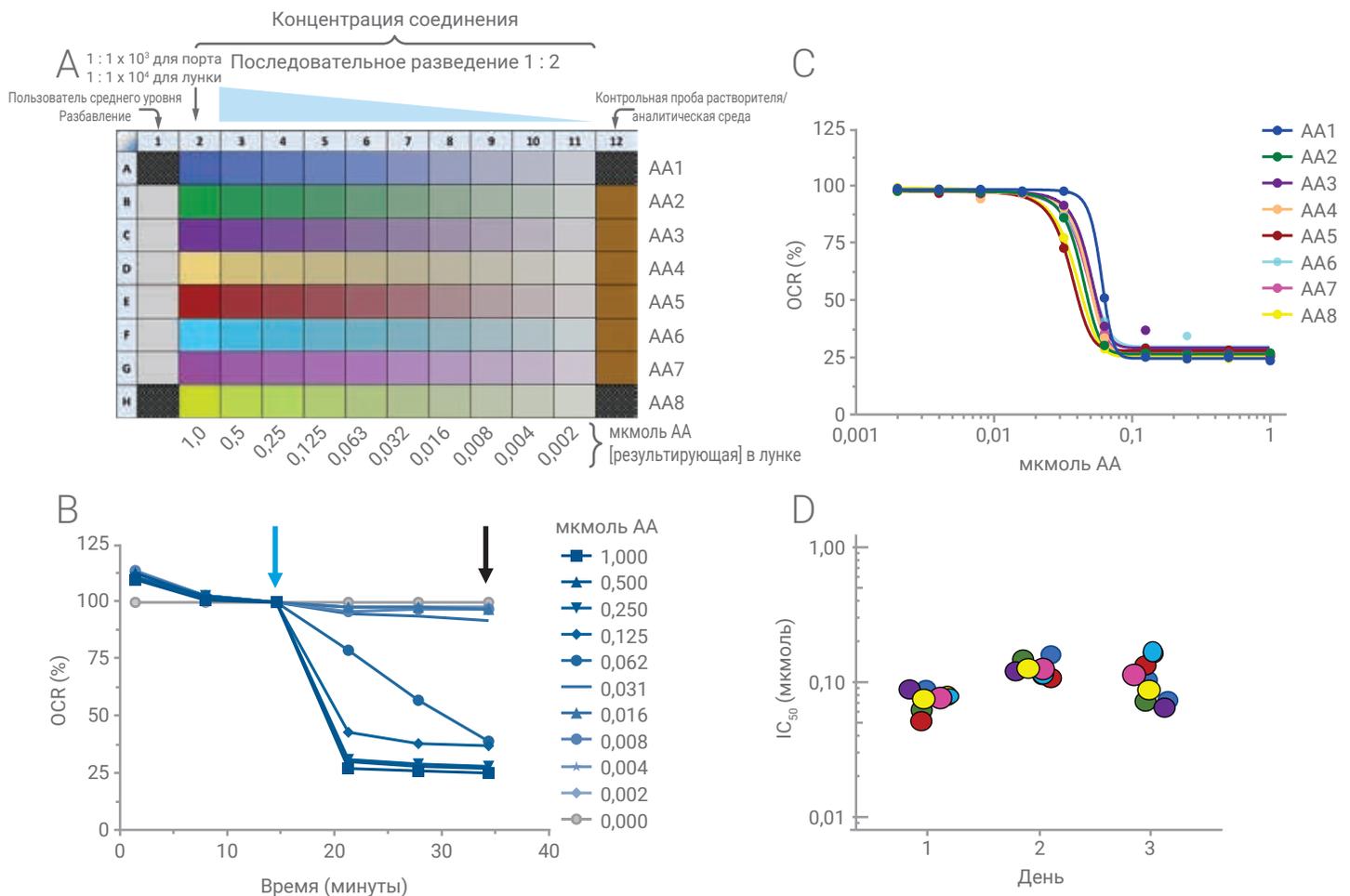
Рис. 9. Параллельные эксперименты на одном микропланшете. Доза FCCP для культуры клеток линии HepG2 увеличивалась в узком диапазоне концентраций (от 0 до 2 мкмоль с шагом 0,2 мкмоль). Растворы FCCP готовили и заливали в патрон с помощью платформы Bravo. А: кинетический график относительного отклика OCR на дозу FCCP. В: кривая зависимости отклика от дозы FCCP для двух независимых экспериментов, N = 8 (8 рядов на одном планшете для каждой кривой). С: относительный отклик OCR (%), СКО и ОСО (%) для всех исследуемых концентраций для первого и второго дня

В работе также оценивали воспроизводимость определения эффективности при проведении параллельных экспериментов на нескольких микропланшетах. В этом эксперименте с помощью платформы Bravo готовили и заливали в порты А патрона датчика XF96 десять последовательных двукратных разведений антимицина А (рис. 10А). Каждое последовательное разведение готовили независимо от других, т. е. исходный раствор помещали в восемь лунок исходного планшета и раствор из каждой лунки разбавляли одновременно с остальными на платформе Bravo с восемью наконечниками для получения восьми независимых серий разведений AA1 – AA8.

Далее выполняли анализ XF: снимали три базальных значения, вводили раствор антимицина А, затем скорость клеточного дыхания измеряли еще три раза (рис. 10В). Отклик рассчитывали как отношение скоростей клеточного дыхания в шестом и третьем измерениях (скорость в третьем измерении считали равной 100%). Затем для поиска значения  $IC_{50}$  для каждого разведения строили график зависимости относительного изменения скорости клеточного дыхания в процентах от концентрации антимицина А в мкмоль (рис. 10С). Результаты

демонстрируют хорошую воспроизводимость для различных серий разведений антимицина А, приготовленных с помощью платформы Bravo, а средние значения  $IC_{50}$  как в пределах одной пластины или дня, так и между ними, отличаются незначительно.

Эти данные, полученные при моделировании анализа на влияние дозы, демонстрируют способность платформы Bravo воспроизводимо готовить сложные серии разведений. Эта воспроизводимость повышает надежность данных каждого планшета параллельных опытов, тем самым позволяя комбинировать данные анализа на влияние дозы с разных планшетов. Как указано выше, приготовление разведений вручную увеличивает погрешность при пипетировании (которая, к тому же, будет распространяться на все последующие разведения), а также повышает риск перекрестного загрязнения разведений. Платформа Bravo увеличивает точность пипетирования малых объемов жидкостей и не допускает перекрестного загрязнения. И наконец, Bravo может заполнить порты патрона XF за один шаг, вместо того чтобы заполнять их по одному, как это делает лаборант, что дополнительно снижает разброс данных и погрешность измерения.



**Рис. 10.** Исследование влияния дозы. А: восемь индивидуальных серий разведений антимицина А, обозначенных как AA1, AA2...AA8. Каждая серия состоит из 10 последовательных двукратных разведений с результирующей концентрацией антимицина А от 0,002 до 1,0 мкмоль. Результирующая концентрация указана под рисунком. В: кинетические данные анализа XF, полученные для одной серии разведений (AA1). С: кривые влияния дозы, полученные для разведений AA1 – AA8 с одного планшета. Д: значения активности антимицина А. Значения  $IC_{50}$  рассчитывали для каждого ряда, как показано на рис. 10А. Каждая точка представляет собой значение  $IC_{50}$  для одной серии разведений (горизонтальный ряд планшета). Значения имеют хорошую воспроизводимость как между отдельными сериями, так и изо дня в день

## Скрининг библиотечных соединений: оценка кратковременного угнетающего воздействия

Для того чтобы проиллюстрировать полную автоматизацию анализа, в работе был проведен скрининг небольшой библиотеки соединений на угнетение гликолиза и митохондриального дыхания. Скрининг выполняли в отношении 72 соединений, входящих в библиотеку «Селлек-Пфайзер» L2400 (рис. 11, вверху). С помощью платформы Bravo исследуемые соединения разбавляли таким образом, чтобы результирующая концентрация была равной 10 мкмоль, и заливали вместе с контрольными растворами во входные порты патрона.

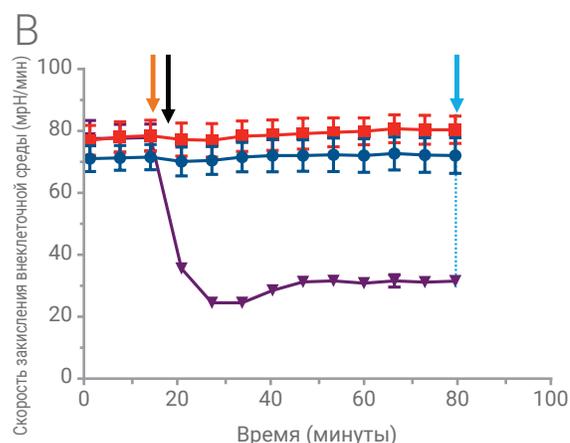
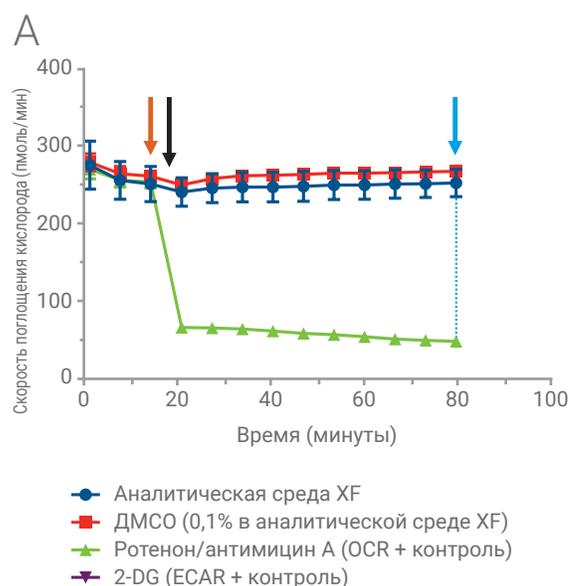
С помощью анализатора Seahorse XFe96 сначала определяли базальные скорости по методике, описанной выше, после чего в лунки вводили исследуемые соединения и записывали их кратковременное влияние на скорости OCR и ECAR в течение 1 часа (рис. 11, внизу). Это влияние рассчитывали как отношение скорости на 80-й минуте (голубая стрелка) к скорости непосредственно перед введением соединения (оранжевая стрелка) и выражали в процентах скорости перед введением соединения. По три параллельных анализа выполняли на протяжении трех дней, в результате чего были получены девять повторных скрининговых планшетов.

Так как для оценки качества результатов анализа обычно применяется Z'-оценка, ее значение рассчитывали для обеих измеренных скоростей для каждого повторного планшета (рис. 12). В качестве положительной контрольной пробы на угнетение митохондриального дыхания применяли смесь антимицина А и ротенона. В качестве положительной контрольной пробы на угнетение гликолиза применяли раствор 2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG). Среднее значение Z'-оценки для анализа на угнетение митохондриального дыхания было 0,88, а для анализа на угнетение гликолиза — 0,77, что демонстрирует хорошее исполнение анализа и высокое качество полученных данных.

На рис. 13 на графике отложены полученные относительные (в процентах) значения OCR и ECAR для всех библиотечных соединений. Как видно из планок погрешностей, представляющих стандартное отклонение для каждого соединения, результаты анализа хорошо воспроизводятся как между планшетами, так и изо дня в день. Эта воспроизводимость и значения Z'-оценки демонстрируют, что анализатор Seahorse XFe96 с платформой Bravo для автоматизации работы с жидкостями — это надежная методика для поиска ингибиторов гликолиза и митохондриального дыхания.

В анализе, который проиллюстрирован на рис. 11, результаты считывали для одной и той же лунки непосредственно перед введением исследуемых соединений и через 1 час после введения. Платформа также позволяет обработать эксперименты, в которых клеточная культура обрабатывается исследуемыми соединениями до выполнения анализа XF для оценки долговременных кинетических эффектов воздействия этих соединений (длительное действие). В таком анализе соединения будут дозироваться с помощью платформы Bravo непосредственно в лунки культурного микропланшета XF с исследуемой клеточной культурой за определенное время до выполнения анализа XF (например, за 24 часа).

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



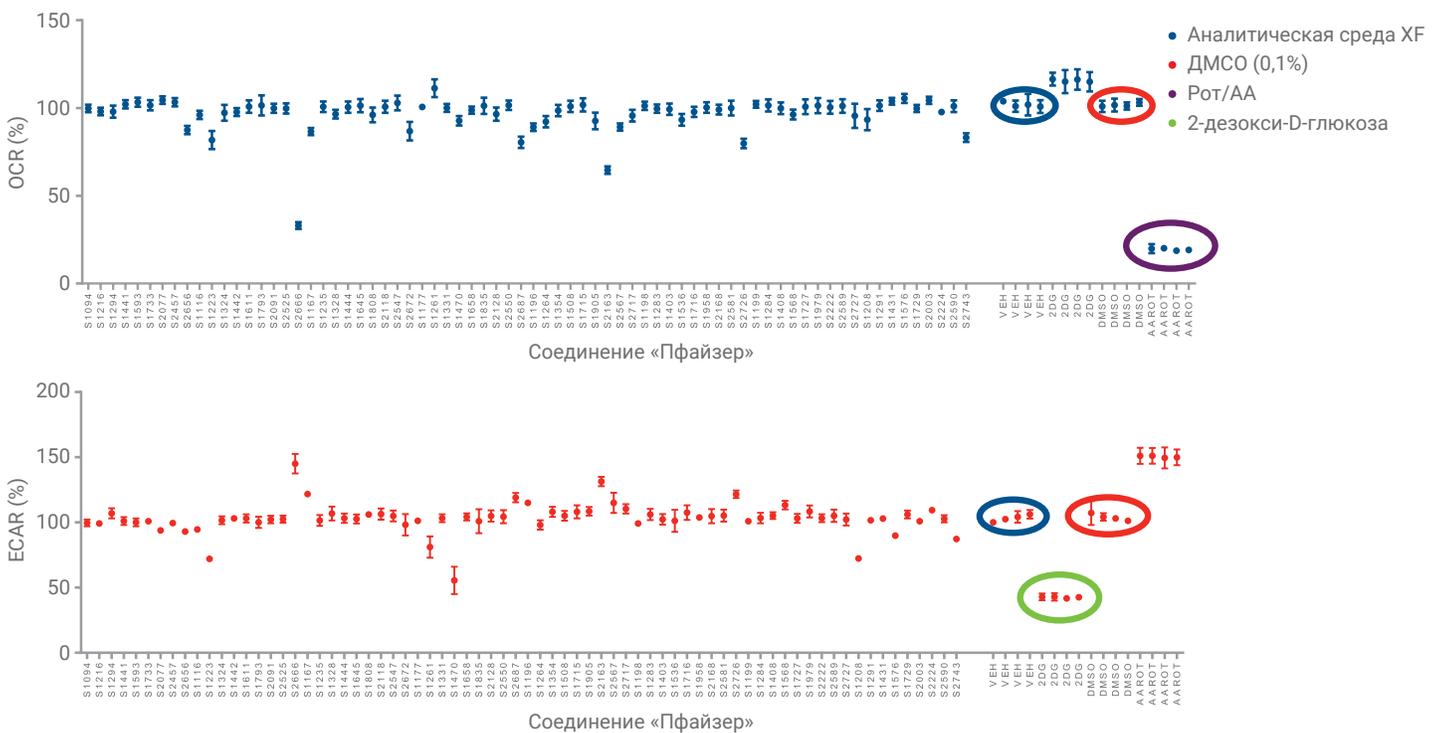
**Рис. 11.** Скрининг библиотечных соединений. Вверху: схема планшета XFe96. Соединения помечены номерами от 1 до 72; AM: аналитическая среда; VEH: контроль ДМСО; 2-DG: положительный контроль на скорость закисления внеклеточной среды (ECAR); AA/рот.: положительный контроль на скорость поглощения кислорода (OCR). Внизу: график анализа XF на OCR (A) и ECAR (B), на котором отмечен момент ввода исследуемых соединений (черная стрелка). Точки данных, на базе которых рассчитывали значения влияния исследуемых соединений в процентах, отмечены оранжевой (100%) и голубой стрелками соответственно

День – планшет	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
<b>СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ Z'</b>	<b>0,88</b>	<b>0,77</b>

Рис. 12. Значения Z'-оценки для параллельных и повторных анализов на кратковременное угнетающее воздействие. Значения Z'-оценки для контрольных образцов на угнетение OCR (ротенон/антимидин А) и ECAR (2-дезоксид-Д-глюкоза) для трех параллельных экспериментов в течение трех дней (n = 9 для каждого соединения)

## Выводы

Данные методические рекомендации демонстрируют методы и эффективность автоматизации работы с жидкостью для пробоподготовки при проведении анализов XF. Использование платформы Bravo для автоматизации этапов промывки клеток, подготовки вводимых растворов и заливки их в порты патрона датчика позволило получить точные и воспроизводимые результаты анализа. Дополнительные преимущества платформы Bravo: 1) снижение случайной погрешности, связанной с многократным пипетированием вручную; 2) увеличение воспроизводимости и надежности данных как в пределах одного планшета, так и между ними; 3) снижение затрат рабочего времени на подготовку анализов XF. Автоматизация основных этапов работы с жидкостями при проведении анализов XF увеличивает эффективность работы и качество полученных данных.



## Дополнительные материалы

Спецификация платформы автоматизированной работы с жидкостями Agilent Bravo для использования с анализаторами XFe96 и XF96 (высоты отсчитываются от дна соответствующего планшета или от соответствующей поверхности)	
Высота отбора жидкости с культурного планшета	3 мм
Скорость отбора жидкости для:	
Культурный планшет XF96	Многоразовый наконечник, 51–200 мкл
Резервуар (86 мл)	По умолчанию
Накопительный планшет (96 лунок)	По умолчанию
24-ячеечный резервуар	По умолчанию
Высота дозирования для:	
Резервуар (86 мл)	2 мм
Патрон XF96	0,5 мм
Скорость дозирования для:	
Культурный планшет XF96	Многоразовый наконечник, медленная промывка
Резервуар (86 мл)	По умолчанию
Патрон XF96	Одноразовый наконечник 384, 10–50 мкл

Табл. S1. Спецификация платформы автоматизированной работы с жидкостями Agilent Bravo для использования с анализаторами XFe96

[www.agilent.com/chem/discoverxf](http://www.agilent.com/chem/discoverxf)

Только для исследовательских целей.  
Не для использования в диагностических процедурах.

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.