

APPLICATION NOTE

在 SpectraMax i3x 读板机上检测氧化代谢和糖酵解活性

Cathleen Salomo | Applications Scientist | Molecular Devices GmbH
Ryan McGarrigle, PhD | Research Scientist | Agilent Technologies Ireland Ltd.
Conn Carey, MSc | Technology Specialist | Agilent Technologies Ireland Ltd.

简介

为了生存，细胞需要 ATP 形式来提供能量维持正常生理活性。这种形式的能量是通过糖酵解和线粒体呼吸过程产生的。当两者都产生 ATP 时，糖酵解在缺乏氧气的情况下可以发挥作用，而线粒体在氧化磷酸化 (OXPHOS) 的最后一步需要氧气参与产生 ATP。这些途径在适应环境压力、底物可用性和缺氧的同时，动态地转变以满足细胞的能量需求。一般而言，测量其动态的变化提供了比单点测量（例如 ATP 终点法）更多的关于代谢反应的信息。呼吸作用受到抑制是药物毒性后线粒体功能紊乱的重要、敏感指标。线粒体功能的异常与越来越多的疾病有关，从神经退行性病变到癌症。

了解这些途径是如何应对效应化合物作出何种反应，可以为了解细胞的整体功能和决定细胞命运的潜在机制提供有用的见解。

新型检测试剂盒的出现和更多功能微孔板读板机的问世，为实现基于微孔板形式的代谢分析提供了有效的手段。这里，我们描述了在 SpectraMax® i3x 微孔读板机上使用 Agilent MitoXpress® Xtra 耗氧量分析和 Agilent pH-Xtra™ 糖酵解分析。

采用基于细胞检测的葡萄糖氧化酶 (GOx) 法，使用标准 96 孔板评价细胞氧耗和糖酵解。

MitoXpress Xtra 耗氧量分析可以直接实时测量细胞耗氧量。该试剂是一种氧敏感的水溶性、穿膜形荧光探针。通过 O₂ 淬灭荧光信号，使得信号与孔中 O₂ 的浓度成反比。随着氧气的消耗，荧光逐渐增加，因此利用动力学测量，用户可以通过监测信号增加的速度来推断线粒体的活性。

The pH-Xtra 糖酵解检测试剂可实时的、动态的检测细胞外的酸化率。糖酵解途径的葡萄糖它可以产生丙酮酸盐，用于在 Krebs 循环中进一步氧化或产生乳酸盐（乳酸），这使得细胞酸化胞外环境。pH 值的变化可使用 pH-Xtra 进行检测，为解糖酵解活性的研究提供了依据。如同 MitoXpress Xtra 一样，pH-Xtra 在生物范围内表现出灵敏的信号反应，可灵活、高通量地评估细胞外酸化率，并且在反应过程中不被消耗。根据荧光信号随时间的变化计算细胞外酸化率。

使用 MitoXpress Xtra 或 pH-Xtra 试剂的为了获得更高的检测灵敏度，建议在微孔板读板机上使用时间分辨荧光检测功能。SpectraMax i3x 微孔板读板机标配光吸收、荧光和发光检测模式。MitoXpress Xtra 和 pH-Xtra 试剂所需的时间分辨荧光检测可通过添加时间分辨 (TRF) 检测卡盒实现。TRF 检测卡盒内置专用光源和发射光滤光片，能够实现更高灵敏度的性能。获取和分析氧气消耗和糖酵解活力过程都可通过使用 Sofmaxpro.org 官网为 SoftMax® Pro 软件 7.0.3 或更高版本提供的预设模板实现。

优势

- 实时监测细胞和微生物耗氧量和其胞外酸化率
- 高灵敏 TRF 检测手段，可实现简单、混合即检测的两步法工作流程
- 预设 SoftMax Pro 模板实现快速数据获取和分析

材料

- HepG2 细胞 (ATCC cat. #HB-8065)
- 来自黑曲霉-IV 型的葡糖氧化酶 (Sigma-Aldrich cat. #G2133)
- 完全生长培养基
 - Dulbecco 的改良 Eagle 培养基-高葡萄糖 (DMEM, Sigma-Aldrich cat. #D5796)
 - 胎牛血清 (Sigma-Aldrich cat. #F2442)
 - 青霉素/链霉素 (Sigma-Aldrich cat. #P4333)
- 测试化合物
 - 抗霉素 A (Sigma-Aldrich cat. #A8674)
 - 乙腈4- (三氟甲氧基) 苯基氯化区 (FCCP, Sigma-Aldrich cat.#C2920)
 - 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG, Sigma-Aldrich cat. #D8375)
 - 寡霉素 A (Sigma-Aldrich cat. #75351)
- MitoXpress Xtra 耗氧量分析试剂 (Agilent Technologies cat. #MX-200-4), 包含:
 - MitoXpress Xtra 试剂
 - 封闭油
- pH-Xtra 糖酵解分析试剂 (Agilent Technologies cat. #PH-200-4), 包含:
 - pH-Xtra 试剂
 - 呼吸缓冲片
- 微孔板
 - 96-孔, 底透, 组织培养微孔板 (Sarstedt cat. #83.3924.300)
 - SpectraMax i3x 多功能微孔读板机 (Molecular Devices, cat. #i3x) 带 TRF 检测卡盒 (Molecular Devices cat. #0200-7008)

方法

对照信号

为了评估信号与空白比 (S:B) 和信号倍数增加 (F0:F), 建立了 96 孔板无细胞动力学实验。针对 MitoXpress Xtra 耗氧量分析建立了如下对照孔:

- Blank (B) = 培养基
 - Signal control (S, F) = 培养基和 MitoXpress Xtra 试剂
 - GOx control (F0) = 培养基和 利用 0.1 mg/mL GOx 脱氧的试剂
- 针对 pH-Xtra 糖酵解分析准备了如下对照:
- Blank (B) = 呼吸缓冲液
 - Signal control (S, F) = 呼吸缓冲液和 pH-Xtra 试剂
 - GOx control (F0) = 包含 pHXtra 试剂和 0.1 mg/mL GOx 的呼吸缓冲液

基于细胞的检测

HepG2 细胞以每孔 50,000 个接种于 96-孔、底透的组织培养微孔板中。细胞培养孔外周围的孔不用于细胞培养, 但需加入 PBS 以避免边缘效应。为了确保细胞的均匀分布, 细胞先在室温下孵育 15 分钟, 然后在孵箱中过夜培养 (95% 湿度下 5% CO₂, 37°C)。

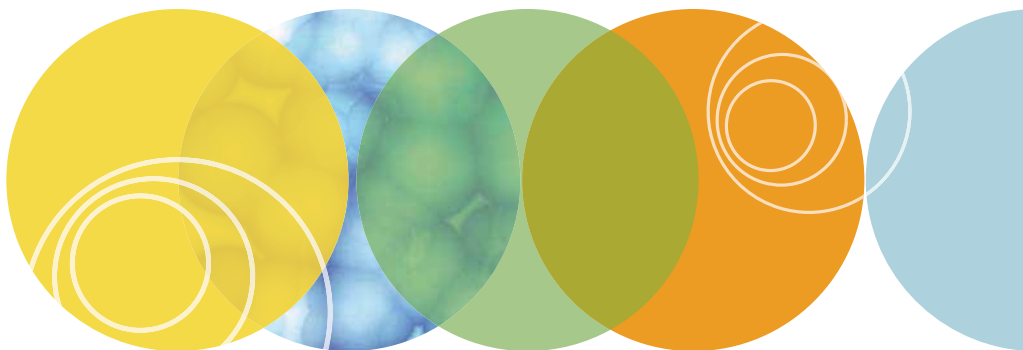
对于 MitoXpress Xtra 耗氧量分析实验, MitoXpress Xtra 试剂溶于 1 mL 去离子水中, 然后在 37°C 下进行如孵育。利用细胞用完全生长培养基小心清洗细胞, 以免将细胞从孔底冲走。在每孔中加入 80 μL 预热的完全生长培养基, 然后将孔板放置在孔板加热器上, 使其平衡到 37°C。使用自动移液器将 10 μL MitoXpress Xtra 试剂加入除空白孔的所有孔中, 而空白孔则代之以加入 10 μL 水。

10 μL 的 10X 化合物 (FCCP、寡霉素、抗霉素 A) 或 0.1% 终浓度的 DMSO 水溶液以 3 个复孔进行加液。每孔顶部加入 100 μL 封闭油以限制氧气进入样品。接下来将孔板移入 SpectraMax i3x 读板机中, 利用 SoftMax Pro 软件 7.0.3 或更高版本中的预置模板进行数据采集。

对于 pH-Xtra 糖酵解分析实验, 细胞检测前首先在 37°C、95% 湿度和无 CO₂ 条件下孵育 2.5 小时。与此同时, pH-Xtra 试剂重溶于 1 mL 去离子水中, 再孵育至 37°C。用 50 mL 去离子水溶解呼吸缓冲片制成呼吸缓冲液, 然后调节 pH 至 7.4, 将溶液过滤灭菌。微孔板中的细胞用呼吸缓冲液小心清洗。每孔加入 80 μL 预热的呼吸缓冲液, 然后将孔板放置在孔板加热器上, 使其平衡到 37°C。使用自动移液器将 10 μL pH-Xtra 试剂加入每孔中。10 μL 的 10X 化合物 (2-脱氧葡萄糖、寡霉素) 或 0.1% 终浓度的 DMSO 水溶液以 3 个复孔进行加液。

数据采集和分析

利用 SpectraMax i3x 读板机上 TRF 检测卡盒获取实验数据。在 TRF 模式下, 针对 MitoXpress Xtra 和 pH-Xtra 试剂的优化检测参数如表 1 所示。每次读数为 100 次信号收集被认为是针对这一实验的最佳选择 (数据未展示)。检测前至少 15 分钟将读板机温度设置到 37°C。将微孔板放入读板机, 利用 SoftMax Pro 软件将动力学数据跟踪记录为一段时间内的强度。动力学读数设置为 2 到 4 分钟间隔, 总时间 45 到 200 分钟。对于每个实验, 选择最短的间隔。



在将数据导出到 Excel 之前，在软件中对数据进行了修正。利用 Excel 中的斜率函数计算氧耗率 (MitoXpress Xtra) 或糖酵解活性 (pH-Xtra)。

在图的线性部分确定斜率，以确保查询样本信号曲线的适当部分。

兼容 Molecular Devices 微孔板读板机的 SoftMax Pro 7.0.3 或更高版本软件预置检测模板，其可从 www.softmaxpro.org 官网下载。推荐的读板机检测参数设置列在模板的仪器设置部分。若要在软件中直接处理数据，请使用动力学运算模式来计算速率。动力学数据的线性部分可以通过在运算对话框中手动选择延迟和结束时间来调整。

结果

MitoXpress Xtra 耗氧量分析实验

为评估最佳仪器设置，使用无细胞动力学实验计算信噪比 (S:B) 和信号倍数增加 (F₀:F)。

SpectraMax i3x 读板机获得了超过 10 倍的 S:B 值，如图 1 所示。为了确定信号的倍数增加，我们检测了一个用 GOx 进行脱氧的 GOx 对照 (F₀)。与加氧信号对照 (F) 相比，GOx 对照的信号大约增加了 3 倍，表明该检测方法的建立是正确的，并且正在检测氧耗量。

细胞实验用于评估 SpectraMax

SpectraMax i3x 读板机与 MitoXpress 实验的兼容性 (图 2)。用两种影响细胞耗氧量的化合物寡霉素和 FCCP 来处理细胞。未经处理的细胞显示，随着培养基中氧的耗尽，MitoXpress Xtra 信号增加。寡霉素通过抑制 ATP 合成酶降低耗氧量，导致耗氧量低于未处理的细胞 (图 2, 寡霉素)。FCCP 通过解偶联 ATP 合成酶的呼吸复合物 (图 2, FCCP) 来增加氧气消耗，因此 FCCP 处理的细胞的耗氧率显著高于未处理的细胞。

Parameter	pH-Xtra Glycolysis Assay	MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay
Optical configuration	TRF-EUSA	
Read type	Kinetic	
Wavelength (automatically set for the detection cartridge)	Ex: 370 nm Em: 616 nm	Ex: 370 nm Em: 642 nm
Plate type	96-well standard clrbtm	
PMT and optics	Integration time: 0.1 ms Excitation time: 0.05 ms Number of pulses: 100 Measurement delay: 0.1 ms Read height: 2.30 mm	Integration time: 0.1 ms Excitation time: 0.05 ms Number of pulses: 100 Measurement delay: 0.03 ms Read height: 2.30 mm
Timing	Total run time: 1 to 2 hours Interval: 2 to 4 minutes	

表 1 SpectraMax i3x 读板机上针对 MitoXpress Xtra 和 pH-Xtra 检测的优化后设置

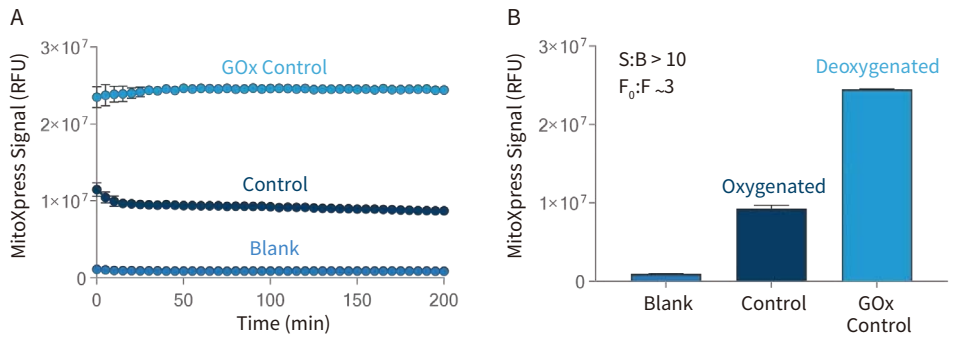


图 1 空白与信号倍数增长的确定。(A) 为空白孔和对照孔绘制信号跟踪图。数据轨迹的平均值是从第 15 点到第 20 点计算的，以避免初始温度平衡，并绘制在 (B) 计算信号空白比 (S:B) 以及信号倍数增长 (F₀:F) (n = 2, ± SD)

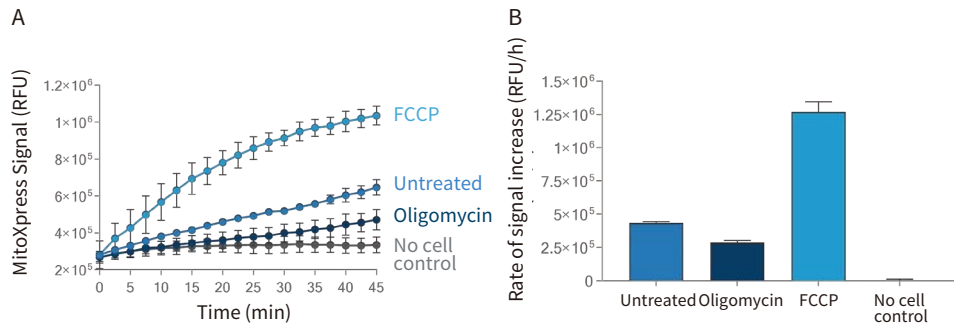


图 2 使用 MitoXpress Xtra 进行细胞耗氧量分析实验。(A) 针对 HepG2 细胞的 MitoXpress Xtra 试剂的信号分布。用寡霉素和 FCCP 处理细胞。(B) 速度是通过取运动轨迹的线性部分的斜率来计算的 (n = 3, ± SD)

pH-Xtra 糖酵解分析实验

与 MitoXpress Xtra 实验一样，测定 pH-Xtra 糖酵解实验的信噪比，以确保最佳读数设置。对照孔的信噪比高于 100 (图 3)。信号对照代表呼吸缓冲液的起始 pH 值。与 MitoXpress Xtra 一样，使用 GOx 对照来确定信号倍数增加。这一对照通过酸化缓冲液与葡萄糖反应产生 H⁺ 离子 (图 3)。信号倍数比呈显著增加 (例如，比值 >3)，表明该检测方法正确建立，并在测定酸化过程中起着重要作用。

pH-Xtra 糖酵解实验评估细胞外酸化的能力如图 4 所示。用两种化合物，寡霉素和 2-DG 处理细胞，调节细胞外酸化。寡霉素处理通过抑制线粒体 ATP 的产生而增加 pH-Xtra 信号 (图 4, 寡霉素)，通过增加糖酵解 ATP 的产生而导致细胞对 ATP 的损失。2-DG 治疗通过竞争性抑制葡萄糖磷酸化降低了信号变化的速率，从而通过糖酵解降低了乳酸盐的产生 (图 4, 2-DG)。

结论

SpectraMax i3x 微孔板读板机其性能高于 Agilent 技术所规定的信号性能标准，并成功地用于基于细胞分析线粒体功能和糖酵解流的测试。预设的用于 Molecular Devices 读板机的 SoftMax Pro 软件模板可用于 MitoXpress Xtra 和 pH-Xtra 测试信号表现以及获取和分析数据。

可以在 Excel 中或直接从 SoftMax Pro 软件中的信号中获得其速率值，并且可以进一步利用数据在软件中进行绘图，或直接导出至其它软件进行曲线拟合和图表制作。

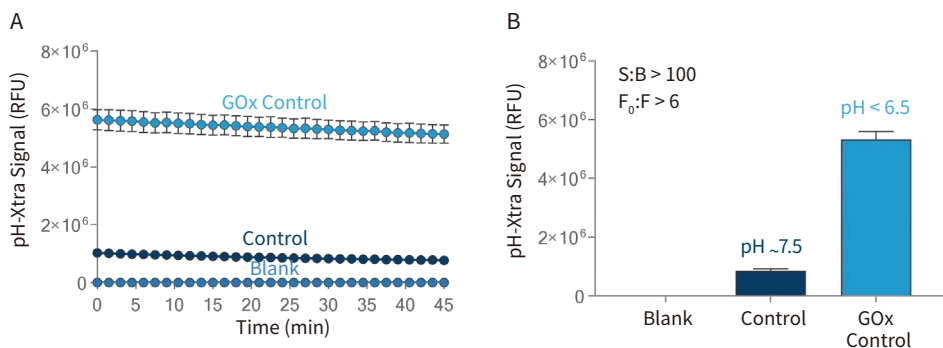


图 3 信号-空白和最大强度计算用于 pH-Xtra 信号跟踪。(A) 为对照孔和空白孔绘制曲线。从第 15 至 20 个数据点计算所有数据轨迹的平均值，并绘制在 (B) 计算信号空白比 (S:B) 以及信号倍数增长 (F₀:F) (n = 2, ± SD)

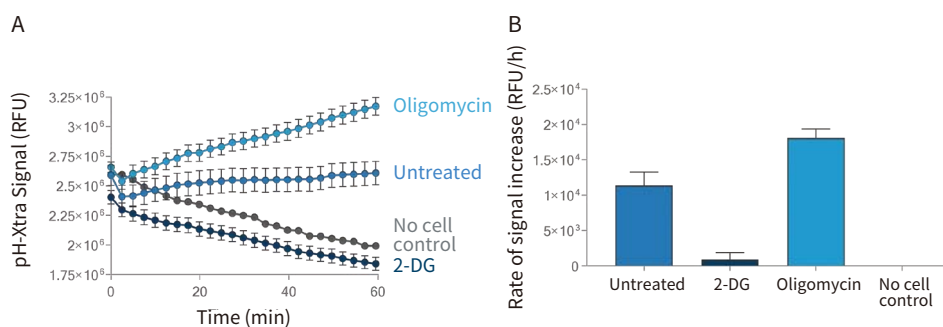


图 4 基于细胞的 pH-Xtra 糖酵解分析实验。(A) pH-Xtra 糖酵解法检测 HepG2 细胞 TRF 信号谱。细胞用寡霉素或 2-DG 处理。(B) 通过获取动力学轨迹的线性部分的斜率来计算速率。将速率校正为无细胞对照。(n = 3, ± SD)



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586
上海 电话: 86-21-3372 1088
北京 电话: 86-10-6410 8669
成都 电话: 86-28-6558 8820
台北 电话: 886-2-2656 7585
香港

www.MolecularDevices.com.cn
Email: info.china@moldev.com
传真: 86-21-3372 1066
传真: 86-10-6410 8601
传真: 86-28-6558 8831
传真: 886-2-2894 8267
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

