

利用安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统对 XF 数据进行归一化

作者

Yoonseok Kam
Kellie Chadwick
Ned Jastromb
Brian P. Dranka
安捷伦科技公司，美国

摘要

任何实验都需要数据归一化才能得出有效结论，尤其是涉及样品数量差异时。对于使用安捷伦 Seahorse XF 技术的实时细胞代谢分析，每孔细胞数是数据归一化普遍接受的参考值。该值可以通过细胞计数直接评估，也可通过测量生物分子（如总蛋白或基因组 DNA）间接评估。安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统集成了 XF 技术与 Cytation 1/5 细胞成像多模式酶标仪 (BioTek Instruments, Inc)。在此配置中，Cytation 1/5 由全新安捷伦 Seahorse XF 成像和细胞计数软件控制，该软件为基于显微图像的细胞计数提供了简单且经过验证的自动化解决方案。该一站式解决方案包括 1) 原位注入可渗透细胞膜的核染色化合物（即 Hoechst 33342），2) 针对 XF 分析优化的自动化成像和细胞计数，以及 3) 在 Wave 软件中将图像和细胞计数同步到 XF 结果文件中。该解决方案为 XF 分析仪用户提供了一种高效可靠的归一化方法以及无缝式快速工作流程。

前言

细胞代谢功能按耗氧率 (OCR) 和细胞外酸化率 (ECAR) 进行测量, 然后采用安捷伦 Seahorse XF 技术进一步转换为质子释放率 (PER) 和 ATP 生成速率等值。与其他生物实验类似, 如果不同孔和实验之间的细胞数存在任何差异, 则应对这些数据进行归一化才能得出有效结论。细胞数的差异可能有多种不同原因, 包括但不限于增殖或死亡率的差异。样品前处理过程中的技术误差也可能是导致差异的原因。无论是什么原因, 每孔细胞数应是归一化时分母的首要选择, 以用于校正存在任何细胞数差异的 XF 分析数据。

每孔细胞数可通过测量细胞组分 (如总蛋白和基因组 DNA) 直接或间接计数。对于大多数用户而言, 后一种方法优于直接细胞计数, 因为直接细胞计数需要时间和专业知识。安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统使用自动化成像和细胞计数工作流程, 提供了一种 XF 数据归一化解决方案。本研究的每孔细胞数由 Cytation 1/5 采集的显微图像计数得到。为识别单个细胞, 细胞核用 Hoechst 33342 (一种可渗透细胞的 DNA 结合荧光探针) 染色, 并用 Cytation 1/5 中的 DAPI 滤光器检测。通过安捷伦 Seahorse XF 成像和细胞计数软件计算并报告图像中的细胞计数。然后将该数据导入 Wave 软件以归一化 XF 数据。

XF 成像和归一化系统包括针对 XF 分析优化的多种独特功能。首先, 通过扫描每个 XF 板的唯一条形码来注册, 然后所有图像数据以及最终细胞计数将自动同步到相应 XF 分析文件。所有信息都记录在 Wave 软件中以便进一步审查。其次, 可在相同工作流程中获得明视场图像, 并对反映每个孔中细胞接种条件的这些图像进行比较, 以便于数据质量管理。第三, 作为默认工作流程, 可渗透细胞膜的核染色染料 Hoechst 33342 包含在任何 XF 分析的最后一次加样中。这样不仅简化了程序, 而且还减少了手动注入染料可能带来的技术误差。在 XF 分析中的最后一组混合和测量步骤过程中对细胞进行染色。然后在完成 XF 分析后, 采用 Cytation 1/5 对细胞成像, 无需任何进一步清洗或固定步骤。此工作流程适用于体外培养的大多数细胞类型。最后, 此过程是在活细胞上进行, 因此仍可进行任何其他分析。例如, 在建议的 XF 成像和归一化系统工作流程之后可进行蛋白质分析或免疫荧光染色, 以获得额外或补充数据。将这些量身定制的功能与明视场成像相结合, 有助于提高 XF 分析仪用户的数据解析能力。

实验部分

归一化验证

RAW264.7、HT29 和 SKOV3 细胞在补充了 10% FBS (HyClone, SH30070.03)、2 mmol/L L-谷氨酰胺 (Corning, 25-005-CI) 和 1 mmol/L 丙酮酸钠 (Corning, 25-000-CI) 的高浓度葡萄糖 DMEM (Gibco, 11960-44) 基础生长培养基中培养。将 A549 细胞在补充了 10% FBS 和 2 mmol/L GlutaMAX (Gibco, 35050-061) 的 DMEM:F12 (Corning, 10-090-CV) 基础生长培养基中培养。将 MCF7 细胞在含有 10% FBS 和 1 mmol/L 丙酮酸钠的 RPMI-1640 (Gibco, 21870) 中培养。将 HepG2 细胞在补充了 10% FBS、2 mmol/L GlutaMAX 和 1 mmol/L 丙酮酸的低浓度葡萄糖 DMEM (Gibco, 11885-084) 中培养。对于 XF96，以五种不同细胞密度接种细胞，其涵盖范围为建议细胞密度的 $\pm 50\%$ ；HepG2 为 1×10^4 个细胞/孔，A549、HT29、MCF7 和 SKOV3 为 2×10^4 个细胞/孔，RAW264.7 为 3×10^4 个细胞/孔。对于 XF24，以三种不同细胞密度接种细胞，涵盖范围为 $\pm 25\%$ ；HepG2 为 2×10^4 个细胞/孔，A549 和 MCF7 为 4×10^4 个细胞/孔。

将细胞培养过夜，按照标准安捷伦 Seahorse XF 细胞能量代谢表型测试方案¹ 测量代谢表型，其中对方案作出以下修改：将 20 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst 33342 (Thermo, 62249) 加入寡霉素/FCCP 混合物中。通过 BioTek Cytation 1/5 使用 XF 细胞成像和计数软件² 对细胞计数，在 Wave 软件中将数据归一化。使用安捷伦 Seahorse XF 细胞能量代谢表型报告生成器比较归一化后的数据变化³。

使用不含酚红的安捷伦 Seahorse XF 基础培养基（安捷伦科技公司，103335-100）中的细胞进行所有 XF 分析，该培养基补充了 10 mmol/L 葡萄糖、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠和 5 mmol/L HEPES，pH 7.4（安捷伦科技公司，103337-100）。

巨噬细胞活化

将 RAW264.7 细胞以 2.5×10^4 个细胞/孔进行接种并培养过夜。然后在含有/不含 100 ng/mL LPS 且含有/不含 20 ng/mL IFN γ 的情况下将细胞进一步培养 16 小时，按照用户手册通过安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试、安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率测定或安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定试剂盒分析代谢速率^{1,4}。每个分析中的最后一次加样溶液鱼藤酮/抗霉素 A 或 2DG，包括了用于核染色的 20 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst 33342。

XF 成像和归一化

利用 XF 细胞成像和计数软件采集明视场和荧光标记的细胞核图像，在 Wave 软件中将分析结果合并入 XF 分析数据，如图 7 所示。在脱气步骤期间采集明视场图像作为质量参考，同时校准探针板²。通过计数 Cytation 1/5 采集的图像中的荧光标记细胞核来测量每孔细胞数。如上所述，Hoechst 33342 包含在 XF 分析方案的最后一次加样中，其中在 XF 细胞线粒体压力测试中加入鱼藤酮/抗霉素 A，在 XF 糖酵解压力测试和 XF 糖酵解速率测定中加入 2DG，以及在 XF 细胞能量代谢表型测试中加入寡霉素/FCCP。

数据展示

本应用简报中展示的 XF 数据是在使用 Wave 软件导出数据后，使用 GraphPad Prism 软件（GraphPad Software, Inc；图 1、4、5 和 6）或 XF 细胞能量代谢表型测试报告生成器（图 2 和图 3）所获得的。

结果与讨论

利用图像中的细胞计数进行数据归一化

作为数据归一化的验证模型，我们通过假设两个基础代谢速率 OCR 和 ECAR 与每孔细胞数成比例相关，将各种细胞类型以三到五种不同的密度接种。只有当细胞对细胞密度变化没有任何生物响应时，这种假设才有实际意义。在所测试的细胞系中，大多数基础代谢速率与通常推荐用于 XF 分析的标准接种密度范围内的细胞密度呈良好线性相关性，只有少数例外（数据未显示）。

图 1 显示了此数据归一化解决方案如何用于 XF 细胞能量代谢表型测试的示例¹。将 RAW264.7 巨噬细胞以四种不同细胞密度在分析前一天进行接种，然后采用安捷伦 Seahorse XFe96 分析仪分析它们的代谢表型。与标准 XF 细胞能量代谢表型测

试的唯一区别在于，同一加药口（箭头）包含可渗透细胞的 Hoechst 33342 染料以及寡霉素/FCCP 化合物。如图 1A 所示，OCR 和 ECAR 随接种密度成比例增加。完成 XF 分析后，通过 XF 成像和细胞计数软件采集荧光图像并计数，如图 1B 所示。图 1C 显示了归一化后的数据，其中将代谢速率除以软件计数得到的细胞数。在应用细胞计数归一化因子后，OCR 和 ECAR 动力学曲线都发生重叠，特别是细胞加样寡霉素和 FCCP 之前的基础速率。值得注意的是，只有在密度差异没有造成生物学变化时，归一化后才会出现这种数据收敛。因此，数据归一化可以鉴定与细胞密度差异相关的真实生物学变化。如图 1C 所示，FCCP 对 OCR 的影响随细胞密度而变化，而寡霉素导致的 ECAR 升高不受细胞密度影响，即使两种速率的基础值收敛良好。

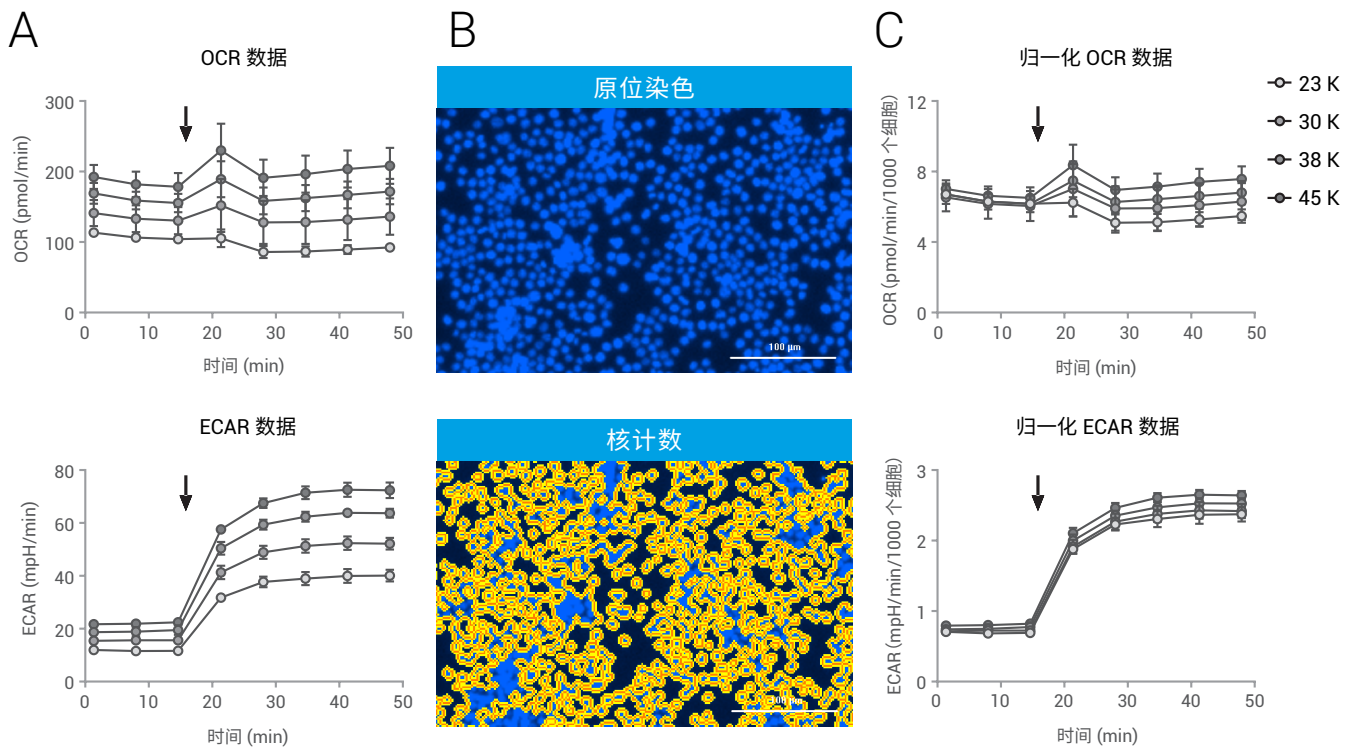


图 1. 使用 XF 成像和归一化系统对 XF 细胞能量代谢表型测试数据进行归一化。如图所示，在分析前一天以不同细胞密度接种 RAW264.7 细胞。在 XF 细胞能量代谢表型分析中，将 Hoechst 33342（终浓度 2 μmol/L）与寡霉素/FCCP 混合物共同加入（箭头）；A) 归一化前的数据；B) 采集的代表性图像和相应核计数结果；C) 归一化结果。以平均值 ± SD 表示数据，n = 6 个技术重复样品。对在团块中生长的细胞也进行了识别和计数

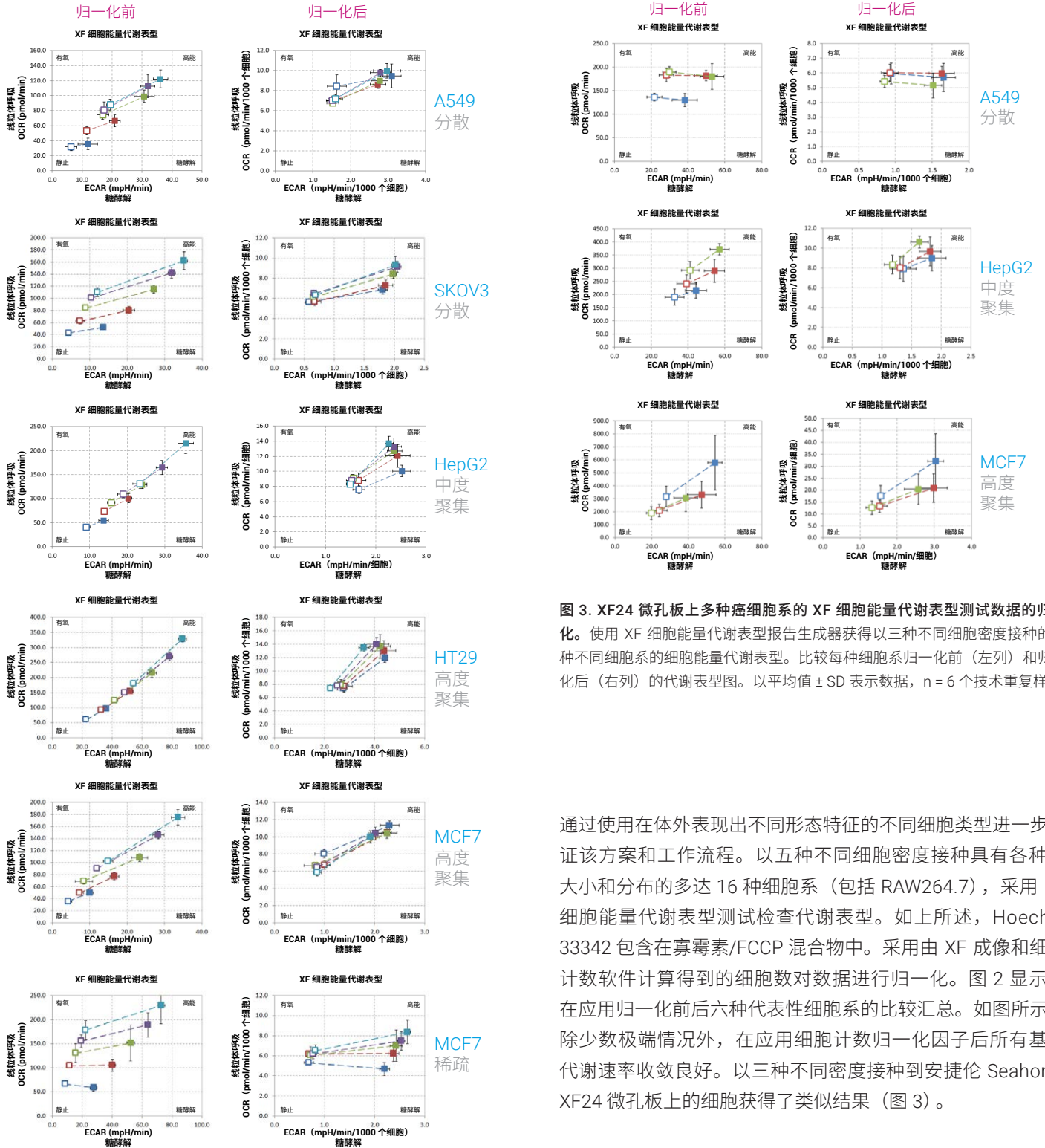


图 3. XF24 微孔板上多种癌细胞系的 XF 细胞能量代谢表型测试数据的归一化。使用 XF 细胞能量代谢表型报告生成器获得以三种不同细胞密度接种的三种不同细胞系的细胞能量代谢表型。比较每种细胞系归一化前（左列）和归一化后（右列）的代谢表型图。以平均值 \pm SD 表示数据，n = 6 个技术重复样品

通过使用在体外表现出不同形态特征的不同细胞类型进一步验证该方案和工作流程。以五种不同细胞密度接种具有各种核大小和分布的多达 16 种细胞系（包括 RAW264.7），采用 XF 细胞能量代谢表型测试检查代谢表型。如上所述，Hoechst 33342 包含在寡霉素/FCCP 混合物中。采用由 XF 成像和细胞计数软件计算得到的细胞数对数据进行归一化。图 2 显示了在应用归一化前后六种代表性细胞系的比较汇总。如图所示，除少数极端情况外，在应用细胞计数归一化因子后所有基础代谢速率收敛良好。以三种不同密度接种到安捷伦 Seahorse XF24 微孔板上的细胞获得了类似结果（图 3）。

图 2. 安捷伦 Seahorse XF96 微孔板上多种癌细胞系的 XF 细胞能量代谢表型测试数据的归一化。使用 XF 细胞能量代谢表型报告生成器获得以五种不同细胞密度接种的六种不同细胞系的细胞能量代谢表型。比较每种细胞系归一化前（左列）和归一化后（右列）的代谢表型图

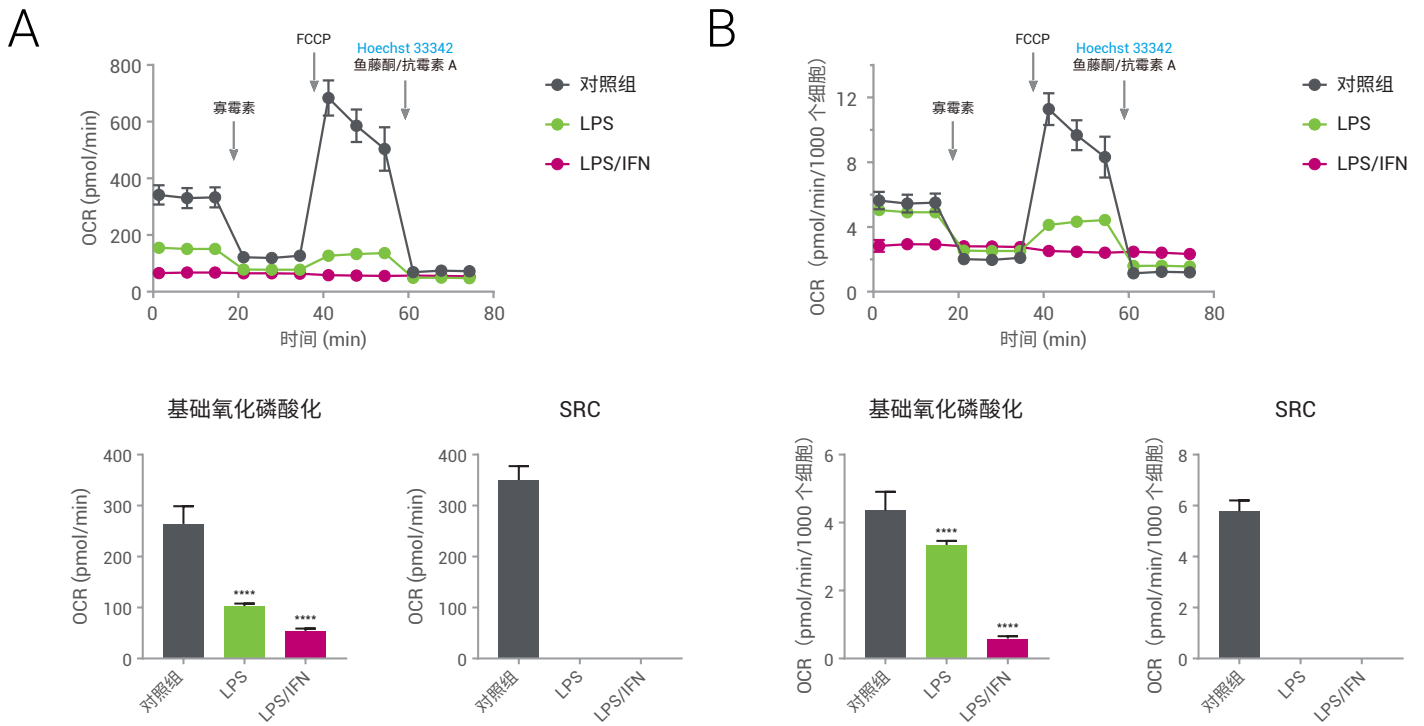


图 4. 数据归一化对 XF 细胞线粒体压力测试结果的影响。将 RAW264.7 细胞在 100 ng/mL LPS 单独存在下或与 20 ng/mL IFN γ 同时存在下培养过夜，通过 XF 细胞线粒体压力测试分析线粒体功能。A) 归一化前；B) 归一化后。以平均值 \pm SD 表示数据，n = 5 个技术重复样品 (ns 为不显著；* 为 $p < 0.05$ ；** 为 $p < 0.005$ ；*** 为 $p < 0.0005$ ；**** 为 $p < 0.00005$)

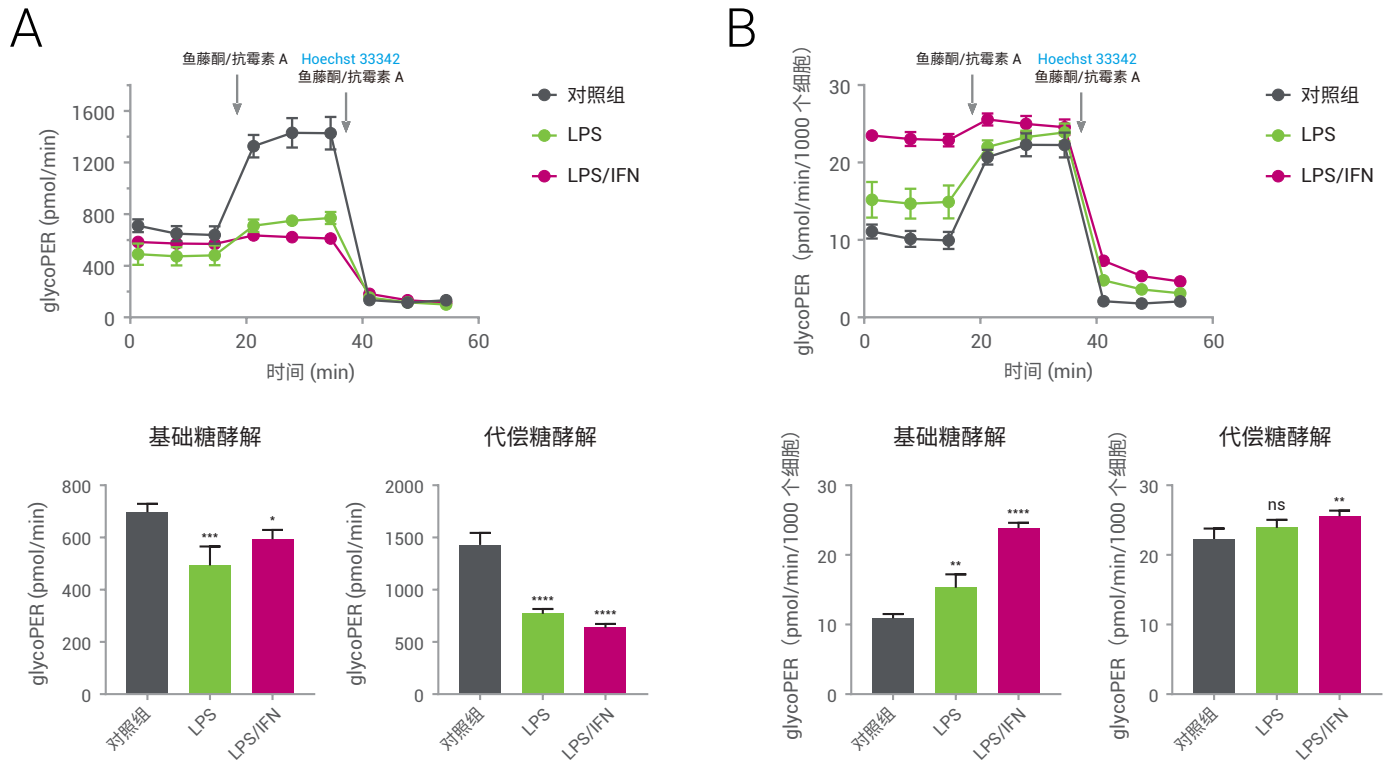


图 5. 数据归一化对 XF 糖酵解速率测定结果的影响。将 RAW264.7 细胞在 100 ng/mL LPS 单独存在下或与 20 ng/mL IFN γ 同时存在下培养过夜，通过 XF 糖酵解速率测定对巨噬细胞活化后的糖酵解活性变化进行分析。比较总体糖酵解质子释放率 (glycoPER) 动力学数据以及基础和代偿糖酵解速率；A) 归一化前；B) 归一化后。以平均值 \pm SD 表示数据，n = 5 个技术重复样品 (ns 为不显著；* 为 $p < 0.05$ ；** 为 $p < 0.005$ ；*** 为 $p < 0.0005$ ；**** 为 $p < 0.00005$)

数据归一化实现正确的数据解析

巨噬细胞是大众熟知的一种免疫细胞，其具有代谢可塑性和与活化相关的动态代谢表型转换。RAW264.7 小鼠巨噬细胞被广泛用作病原刺激引起的体外促炎活化的模型。体外暴露于细菌脂多糖 (LPS) 和/或细胞因子干扰素- γ (IFN γ) 可触发与活化相关的代谢变化，RAW264.7 巨噬细胞从氧化表型转换为糖酵解表型。这一结果可通过 ECAR (或 PER) 的增加和 OCR 的减少得到证明⁵。然而，应将代谢速率归一化以进行定量比较，因为巨噬细胞活化与增殖速率变化紧密相关，活化后增殖速率大大降低。

图 4 为数据归一化如何影响 XF 细胞线粒体压力测试结果的数据解析的示例¹。图 4A 是归一化前的数据汇总，单独的 LPS 或 LPS/IFN γ 共刺激严重抑制了基础线粒体呼吸和备用呼吸能力 (SRC)。然而，当数据按细胞数进行归一化时，数据解析结果有所不同。尽管单独的 LPS 抑制了线粒体呼吸，但这一影响更针对 SRC，而大部分的基础呼吸得到保留。相反，LPS/IFN γ 共刺激完全抑制了线粒体功能，包括基础呼吸 (图 4B)。

对 XF 糖酵解速率测定¹ 结果的解析受数据归一化的影响更大 (图 5)。在没有归一化的情况下，巨噬细胞的糖酵解速率在基础测量中略微下调，对于活化时的代偿活性下调更严重 (图 5A)。通过考虑图 4A 中所示的 XF 细胞线粒体压力测试结果，似乎发生了整体代谢抑制，而没有发生任何明显的表型转换。然而，根据图 5B 中所示的归一化数据，基础糖酵解受 LPS 刺激明显上调，且 IFN γ 共刺激使基础糖酵解速率达到最大。有趣的是，当用 LPS/IFN γ 处理时，即使完全抑制线粒体呼吸，代偿糖酵解的变化也很小 (图 4)。

通过比较线粒体呼吸和糖酵解对 ATP 生成的影响，可更准确地表征代谢转换。图 6 所示为安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定^{1,4} 结果，结果表明 LPS 刺激产生的巨噬细胞更多地依赖于糖酵解 ATP 生成，而 LPS/IFN γ 共刺激产生的巨噬细胞则完全依赖于糖酵解。未归一化时，总 ATP 生成速率似乎在活化后受到抑制。然而，数据显示每个细胞的总 ATP 生成速率保持稳定，并且明显表明由于线粒体呼吸下调，细胞表现出完全糖酵解表型。

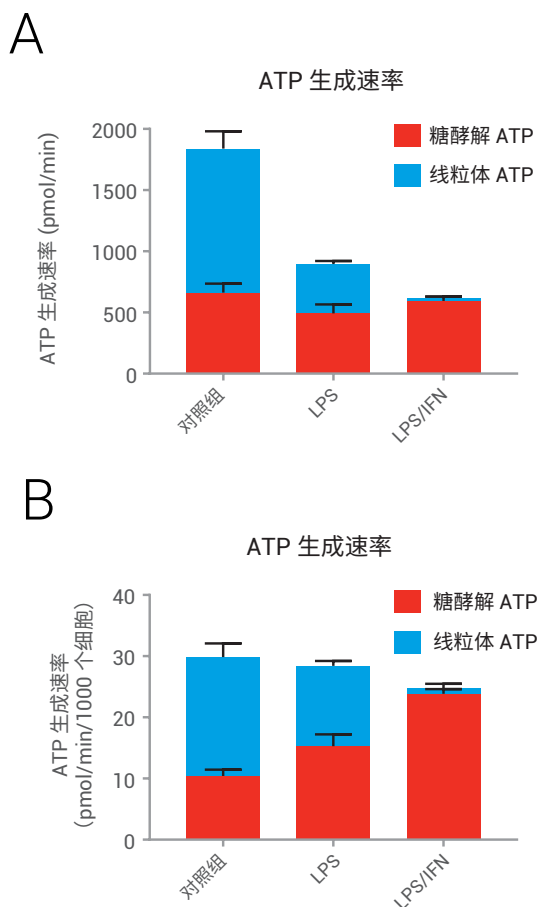


图 6. 数据归一化对 ATP 生成速率的影响比较。在 RAW264.7 巨噬细胞过夜活化后，比较线粒体呼吸和糖酵解对 ATP 生成的影响；A) 归一化前；B) 归一化后。以平均值 \pm SD 表示数据，n = 5 个技术重复样品

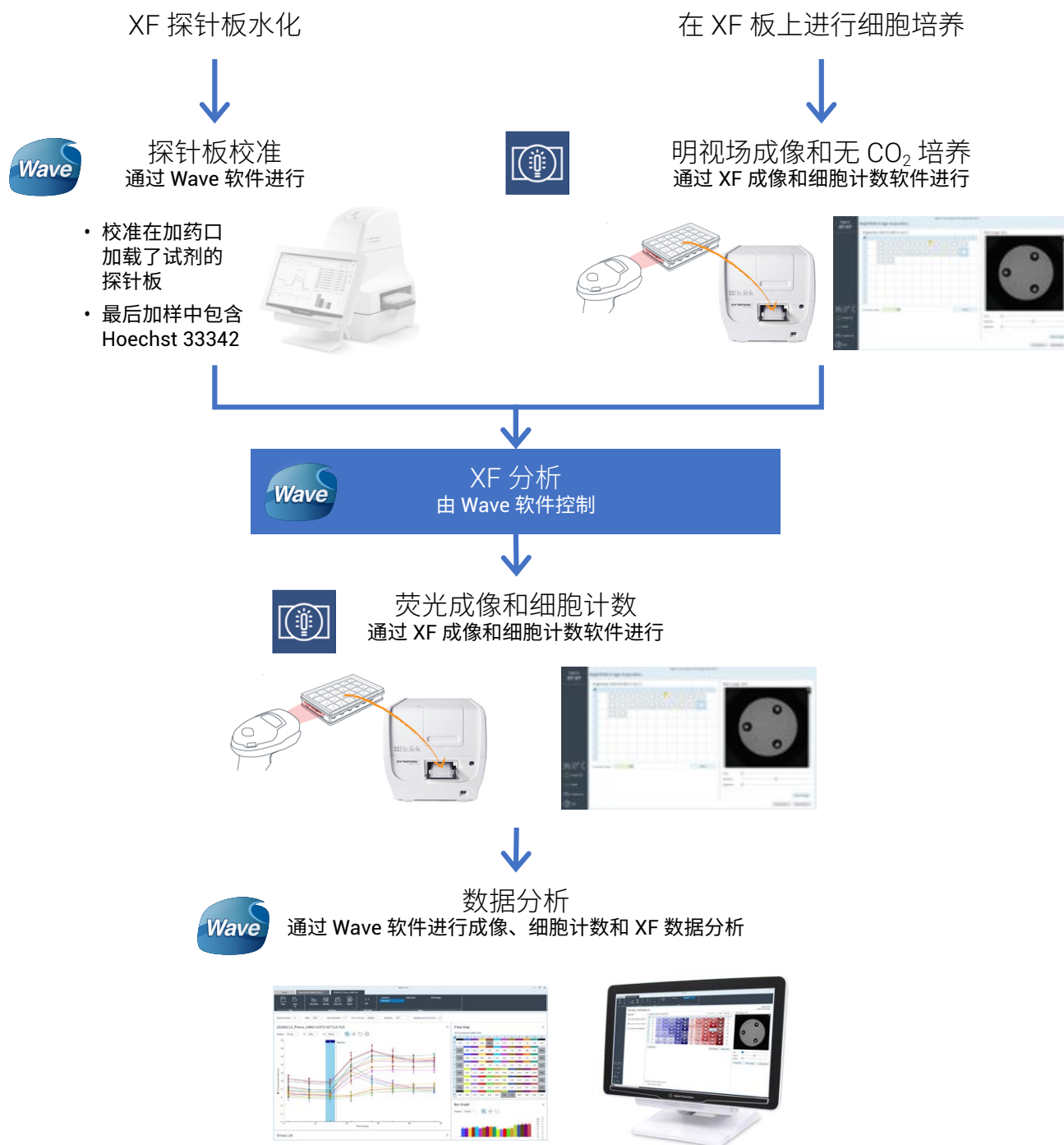


图 7. XF 成像和归一化系统的典型工作流程

细胞计数和数据归一化工作流程

细胞核荧光染色是一种广泛使用的识别单个细胞的方法，因为该方法可使细胞在显微图像中被分割成单个对象，适用于大多数二维细胞培养。Hoechst 33342 是最常用的可渗透细胞膜的蓝色染料，可以染色活细胞核，然后可进行显微镜成像和分析，或采用流式细胞仪计数。在推荐的工作流程中，Hoechst 33342 与 XF 分析试剂盒加样策略中的最后加样试剂结合使用。将染料与用于 XF 分析的试剂盒试剂（例如，XF 细胞线粒体压力测试和 XF 实时 ATP 速率测定中的鱼藤酮/抗霉素 A 混合物，XF 糖酵解速率测定中的 2DG 等）一起直接加样。加入的染料在最后三到五个测量周期中与细胞核结合。由于 Hoechst 33342 标记的细胞核可在没有任何额外清洗步骤的情况下进行检测和识别，因此在完成 XF 分析后，可采用 Cytation 1/5 立即进行细胞成像。这些细胞数通过 XF 成像和细胞计数软件计算得出，并用作转换 XF 数据的准确且可重现的归一化因子（图 7）。

准确细胞计数的注意事项

尽管该软件通过自动阈值算法为大多数用于 XF 分析的细胞类型提供了优化的细胞计数解决方案，但仍需要考虑多个因素才能获得准确的细胞计数以实现最佳归一化性能。均匀染色可检测的细胞核对于获得更准确的细胞计数至关重要。建议在 XF 成像和细胞计数软件中查看蒙版图像。蒙版图像是一个图像层，代表该算法的细胞核检测，其被叠加在原始荧光图像上，并验证所有有效对象均得到软件识别。在 XF 成像和细胞计数软件中完成细胞计数的后处理步骤之后，可使用该检查功能。如果在蒙版图像中大量细胞未得到识别，则用户需要考虑下述段落所述的选项来归一化数据。

首先，有些细胞类型不适用于原位细胞核染色。例如，Hoechst 33342 可由 ABCG2 转运蛋白运出，ABCG2 转运蛋白在造血干细胞中表达，从而导致染料保留性较差⁶。对于这类细胞，原位染色可能不适用，固定后染色可能是首选方法。成像和计数仍可在 XF 成像和细胞计数软件中进行，且仍可利用数据库中读取的通用条形码将数据自动链接到相应 XF 数据。

其次，细胞核染色强度的不一致也会影响细胞核识别。与其他 DNA 结合染料类似，Hoechst 33342 对凝聚染色体具有更高的亲和性，凝聚染色体通常存在于凋亡细胞中⁷。如果细胞样品在健康细胞和垂死细胞之间表现出较大荧光强度差异，则自动阈值算法可能无法正常工作。用户可能需要在 BioTek Instruments 的 Gen5 软件中重新分析图像数据，并自定义细胞计数参数（包括阈值设置）。由 Gen5 获得的计数结果可手动传输至 Wave 中的 XF 数据。

第三，细胞接种条件也是影响归一化性能的关键因素。细胞应进行亚融合接种且均匀分布，以实现准确归一化和最佳 XF 分析性能。与提供全孔图像的明视场成像不同，XF 成像和细胞计数软件使用采集每个孔的中心部分的单一图像。在该图像内对细胞核进行计数，然后软件通过外推法计算每孔细胞总数。成像中心部分与最有效地测量氧和 pH 的区域紧密重叠。因此，与 OCR 和 ECAR 计算类似，在假设细胞均匀分布于每个孔的整个区域的情况下进行自动细胞计数。可使用明视场成像来查看细胞接种条件，如有需要，可以识别并排除任何易出错的孔²。

最后，孔内或孔下的任何较大异物都可能会通过散射激发光影响荧光图像。原位染色可在染色期间避免 XF 板暴露于开放环境中，从而防止出现异物。此外，可在 XF 成像和细胞计数软件以及 Wave 软件中通过明视场和荧光图像来检查任何较大的异物污染。

方案修改

可以根据用户偏好修改细胞核染色步骤。如果有可用的加药口，则可以在整个分析完成之后通过探针板单独加入 Hoechst 33342（例如，在 XF 细胞线粒体压力测试的标准运行之后通过加药口 D 加入 Hoechst 33342）。但是，在标准方案中添加额外加样时，如果用户想要运行 XF 报告生成器，则需要验证数据兼容性。例如，在 XF 糖酵解速率测定中，在 2DG 后额外加入 Hoechst 33342 与 XF 糖酵解速率测定报告生成器不兼容，因为其使用最后测量作为参考值来评估基础和代偿糖酵解速率。

结论

通过一个 XF 64 位控制器运行 XFe96 或 XFe24 分析仪和 Cytation 1/5, XF 成像和归一化系统提供了一种简单、快速的无缝式工作流程,可重现地生成每孔细胞计数,以执行 XF 数据的归一化。通过 XF 成像和细胞计数软件获得细胞图像和计数,数据可自动同步并记录在 Wave XF 结果文件中。这使用户能够更成功地执行 XF 分析且可确保数据完整性,从而实现最佳且有效的数据解析。

参考文献

1. <http://www.agilent.com/chem/discoverxf>
2. <http://www.agilent.com/chem/normalization>
3. <https://www.agilent.com/en/support/cell-analysis/seahorse-xf-report-generators>
4. <http://www.agilent.com/chem/realtimetrp>
5. <http://www.agilent.com/chem/immunology>
6. Scharenberg, C.W., Harkey, M.A. and Torok-Storb, B. (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99, 507-512
7. Ellwart, J.W. and Dörmer, P. (1990) Vitality measurement using spectrum shift in Hoechst 33342 stained cells. *Cytometry* 11, 239-243

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/discoverxf

仅限研究使用。
不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年6月21日，中国出版
5994-0022ZHCN

