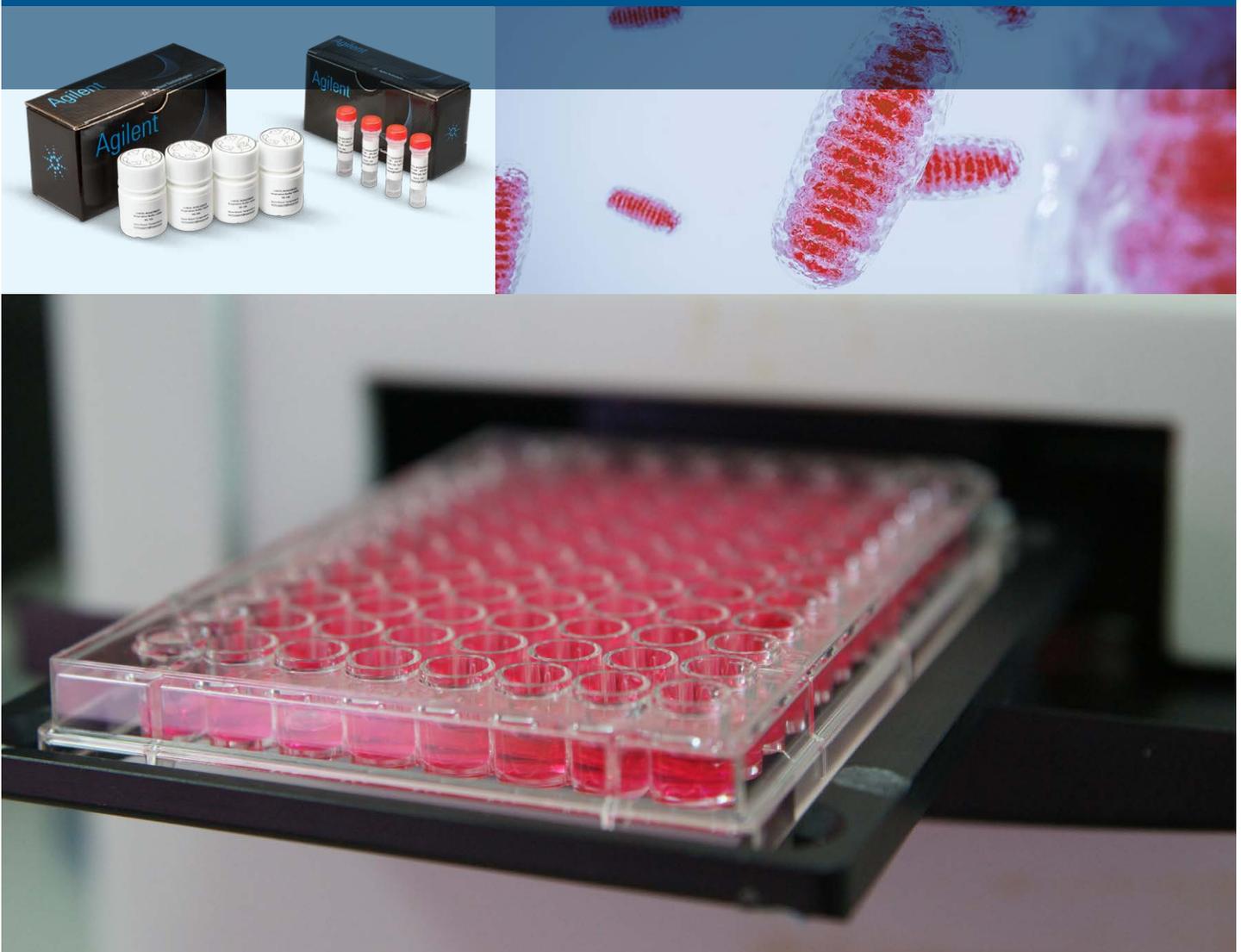


# 利用酶标仪测量细胞代谢的 安捷伦解决方案



# 将酶标仪的潜力发挥到极致



了解 Agilent MitoXpress Xtra 耗氧量分析、Agilent pH Xtra 糖酵解分析和 Agilent MitoXpress Intra 细胞内氧含量分析可以如何帮助您：

- 测量活细胞中的线粒体活性和糖酵解
- 不再局限于间接的终点式细胞分析，通过“混合-检测”直接进行线粒体功能、糖酵解活性和细胞氧化代谢评估，并获得丰富的信息
- 配合其他相关分析实现多重分析
- 不再局限于单层细胞，还能测定悬浮细胞、微生物和特定的 3D 培养物
- 通过在标准微孔板中进行简单的“混合-检测”代谢分析提高通量
- 以高通量的形式方便地测量分离的线粒体
- 探究氧含量与细胞代谢变化之间的联系

# MitoXpress Xtra 耗氧量分析

## 测量细胞耗氧量



耗氧量测量结果是细胞代谢功能，更具体而言是线粒体功能的关键性指标。通过这类测量来探究活细胞代谢，可为细胞功能以及代谢变化在疾病进展中的作用提供机理研究。

MitoXpress Xtra 耗氧量分析是研究代谢的有用工具。它提供了一种简单的有氧代谢动力学测量方法，可以使用荧光酶标仪在标准微孔板上进行测量。随着呼吸作用的进行，样品中的氧气浓度降低，导致 MitoXpress Xtra 分析的信号增加，从而实现了对耗氧量的测定。

图 1 显示了利用 MitoXpress Xtra 分析研究人 iPSC 衍生心肌细胞 (Cor.4U, NCardia) 的耗氧量。在用解偶联剂 FCCP 处理的细胞中，由于呼吸作用增加，信号变化率也随之增加。而用线粒体呼吸抑制剂抗霉素 A 处理则产生了相反的效果。由于耗氧量减少，信号变化率也降低。这些测定可以在多种培养基配方中进行，有助于灵活的实验分析设计。

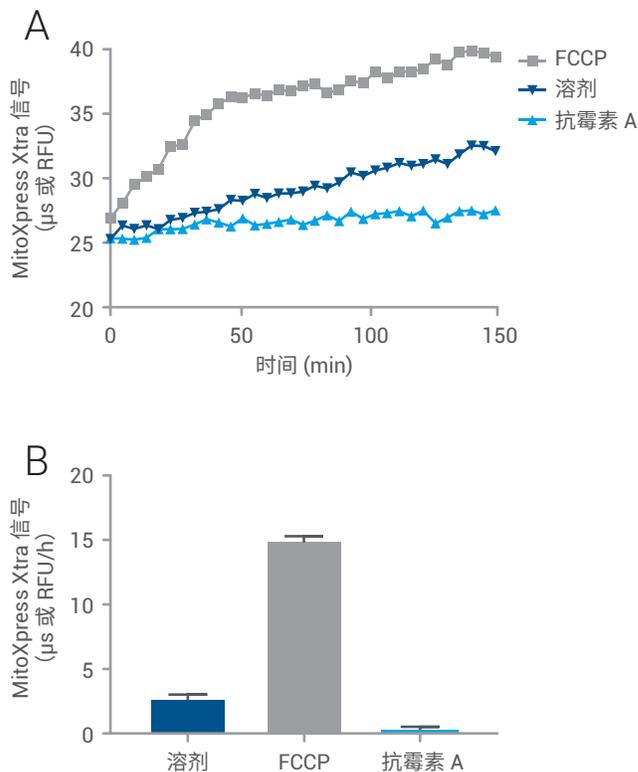


图 1. (A) 使用 Agilent MitoXpress Xtra 分析测定 Cor.4U (NCardia) 的耗氧量。细胞呼吸时会消耗溶解氧，使 MitoXpress Xtra 信号增加。抗霉素 A（线粒体呼吸抑制剂）处理抑制了氧消耗，因此，探针信号变化率也随之减小。使用 FCCP（解偶联剂）处理时耗氧量增加，探针信号变化率也随之增加。(B) 这些代谢效应可以通过分析 MitoXpress Xtra 信号的变化率来评估，变化率低表明有氧代谢活动减少

# 用于毒理学的 MitoXpress Xtra 解决方案

## 筛选药源性毒性

药源性线粒体功能障碍与多种药物类别有关，并且研究证明其可显著引起肝脏、心脏、肾脏、肌肉和中枢神经系统毒性。

得益于微孔板形式和分析性能，MitoXpress Xtra 分析为药源性线粒体功能障碍的早期筛选以及生成剂量-响应曲线提供了一种方便的解决方案（图 2）。这些研究可采用一系列相关的体外模型进行，包括原代肝细胞和 hiPSC 衍生的心肌细胞和肝细胞。

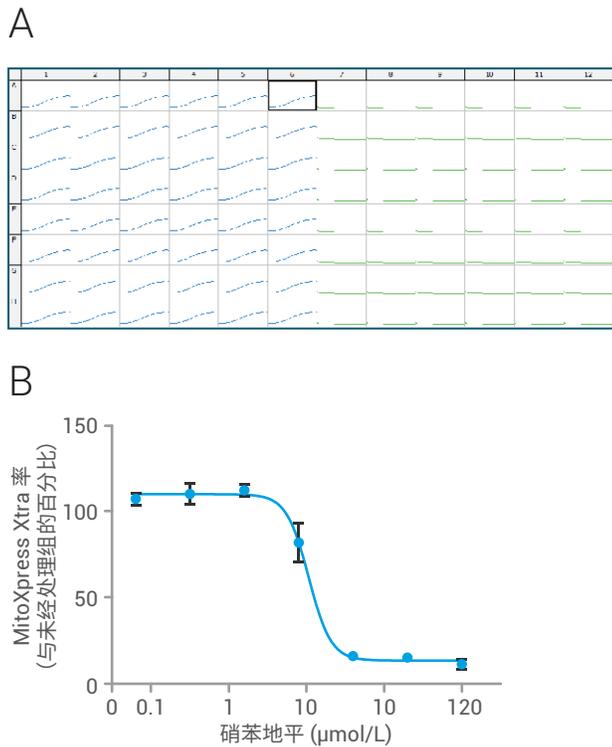


图 2. (A) 利用 Agilent MitoXpress Xtra 分析测定 hiPS-HEP 细胞 (Clontech) 的耗氧量, Z' 因子约为 0.7。(B) 硝苯地平 (钙通道阻滞剂) 对 Cor.4U 心肌细胞线粒体呼吸的剂量-响应曲线。这些值由斜率 (已用溶剂对照进行归一化处理) 得到

## 测量分离的线粒体的呼吸

利用 MitoXpress Xtra 能更容易地测量分离的线粒体的呼吸。该分析能够在常规荧光酶标仪上进行，可以基于微孔板直接进行方便、高通量的电子传递链 (ETC) 活性评估 (图 3A)。这有利于更方便地进行化合物筛选和剂量-响应分析 (图 3B)。此外，利用特定的底物和抑制剂组合，可以对单个 ETC 复合物和相关的线粒体蛋白进行更详细的机制评估。与传统的极谱法相比，MitoXpress Xtra 分析所需的样品量相对较少，因此每次分离可以进行更多的重复。低样品量需求显著增加了由单次线粒体制备可获得的数据量，尤其是在使用 384 孔板时。

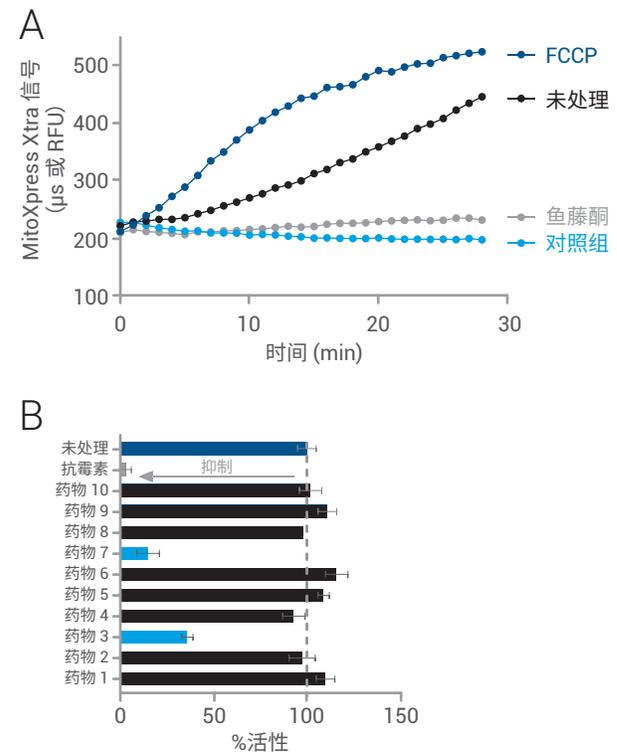


图 3. 使用 Agilent MitoXpress 分析测定分离线粒体 (大鼠肝脏) 的呼吸 (A) 显示了用经典的线粒体调节剂处理后的抑制和解偶联作用。(B) 使用大鼠肝脏线粒体筛选一组未知药物以鉴定药源性线粒体功能障碍 (药物 3 和 7)

# 用于多重分析的 MitoXpress Xtra 解决方案

## 线粒体功能的多参数和多重评估

将 MitoXpress Xtra 或 pH Xtra 分析与其他相关的酶标仪兼容参数如线粒体膜电位 (MMP)、活性氧 (ROS) 或细胞 ATP 含量的测定相结合, 可以实现对细胞反应的进一步了解。这样一来, 研究人员能够更好地研究各种处理或条件变化对细胞功能的影响。这还有助于将观察到的代谢干扰结合其他测定来分析而无需进行平行处理或使用不同的技术平台。

一个例子是利用细胞活力 (Calcein AM) 和线粒体呼吸 (MitoXpress Xtra) 的多重测定, 更好地理解药物处理对细胞功能的脱靶效应 (图 4)。

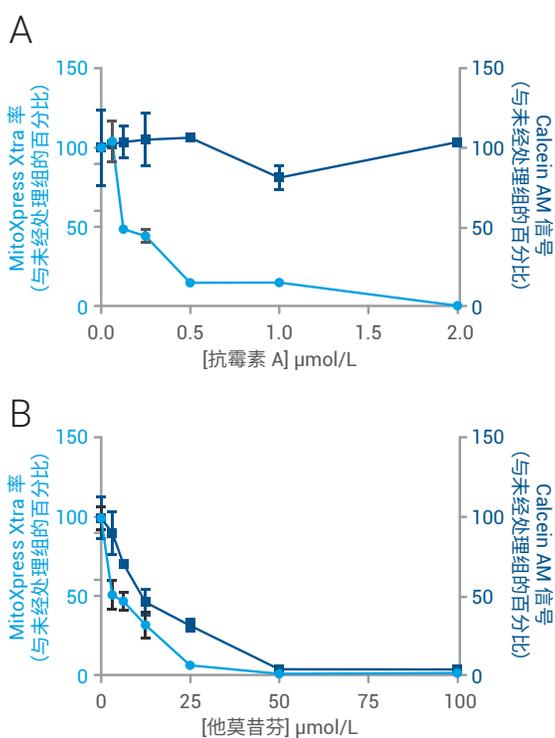


图 4. (A) 抗霉素 A 和 (B) 他莫昔芬处理 HepG2 细胞 24 小时的 Agilent MitoXpress Xtra 信号和 Calcein AM 多重测定。两种药物都能减弱线粒体呼吸 (浅蓝色)。他莫昔芬对细胞活力表现出显著影响, 而抗霉素 A 处理并未显著降低细胞活力 (深蓝色)。这表明, 抗霉素 A 对呼吸的影响是由更直接的线粒体机制引起的

MMP 和 ROS 的产生等线粒体功能指标也可以与耗氧量同时评估。当研究线粒体在细胞生理学中的作用时, 这些参数备受关注。

图 5 显示了代谢调节剂 FCCP 和抗霉素 A 处理的 HepG2 细胞中的 MitoXpress Xtra 和 MMP (使用 JC-1) 多重测定。这两种化合物均可降低膜电位。但是, 可以看到两者对耗氧量的影响不同, 证明了测定多个相关参数可以提供更多信息。

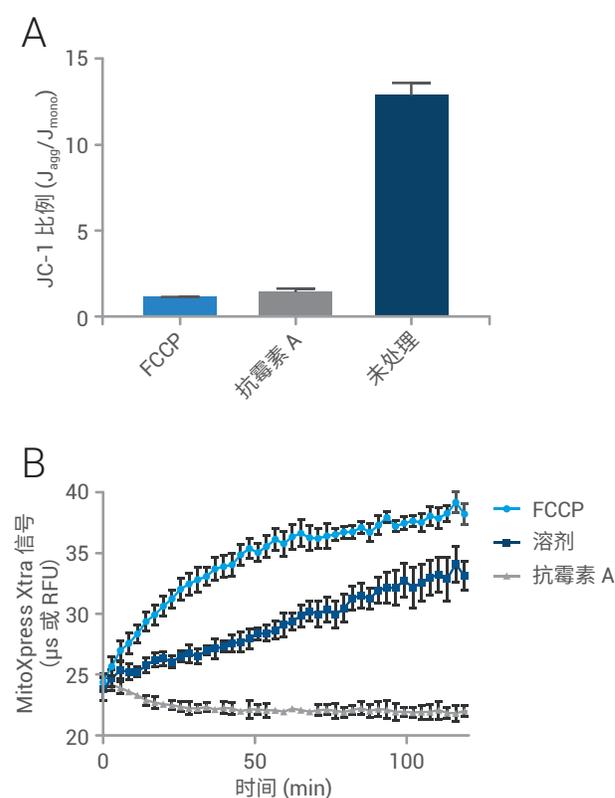


图 5. 在同一孔中进行 Agilent MitoXpress Xtra 信号和 JC-1 测定。使用抗霉素 A 或 FCCP 处理 HepG2 细胞。两种化合物均引起 MMP 降低 (A), FCCP 引起耗氧量的特征性增加, 而抗霉素 A 则抑制呼吸 (B)

# 用于测量微生物代谢的 MitoXpress Xtra 解决方案

## 测量微生物的增殖、代谢和对抗生素的响应

MitoXpress Xtra 分析提供了一种基于酶标仪的简单、灵敏的方法，用以测定原核细胞生长或筛选抗菌化合物，无需进行多次样品稀释或基于琼脂的冗长的研究。并且为微生物代谢研究提供了一种有价值的方法。

酶标仪的检测形式提供了筛选所需的通量和分辨率，且便于生成  $IC_{50}$  或 MIC 数据。图 6 显示了如何应用该方法来评估微生物增殖、生成剂量-响应数据，以及评估两种化合物处理对酵母代谢的特异性影响。

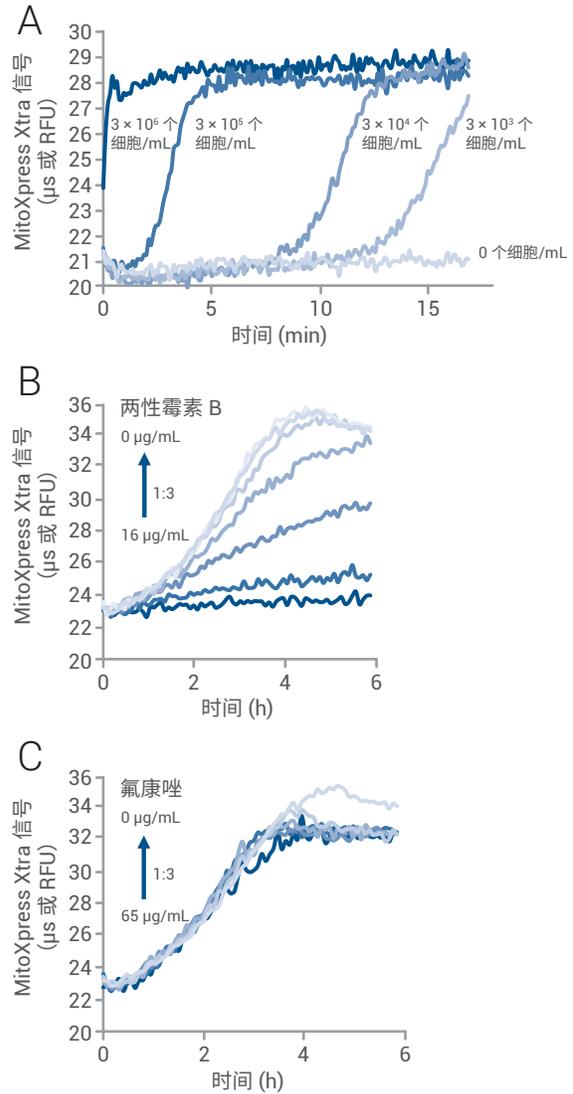


图 6. 接种浓度不断降低时白色念珠菌 (*C. albicans*) 的耗氧量曲线 (A)。用浓度不断增加的两性霉素 B (B) 和氟康唑 (C) 处理白色念珠菌。耗氧量随两性霉素 B 剂量的增加而减少，而氟康唑剂量变化并未使耗氧量减少。这些观察结果与药物作用方式相关

# pH Xtra 糖酵解分析

## 测量糖酵解活性



细胞外酸化测量可以为糖酵解活性研究提供丰富的信息，并且可以方便地在时间分辨荧光 (TRF) 酶标仪上利用 pH Xtra 糖酵解分析进行。细胞外酸化在很大程度上是由丙酮酸转化为乳酸引起的，这将导致分析缓冲液 pH 降低。pH Xtra 探针可以灵敏地检测到 pH 降低，并表现为探针信号增加。

这些 pH 测量为各种生理和病理生理过程（包括癌症和细胞对缺氧的适应性）中糖酵解活性改变所发挥的核心作用提供了重要见解。

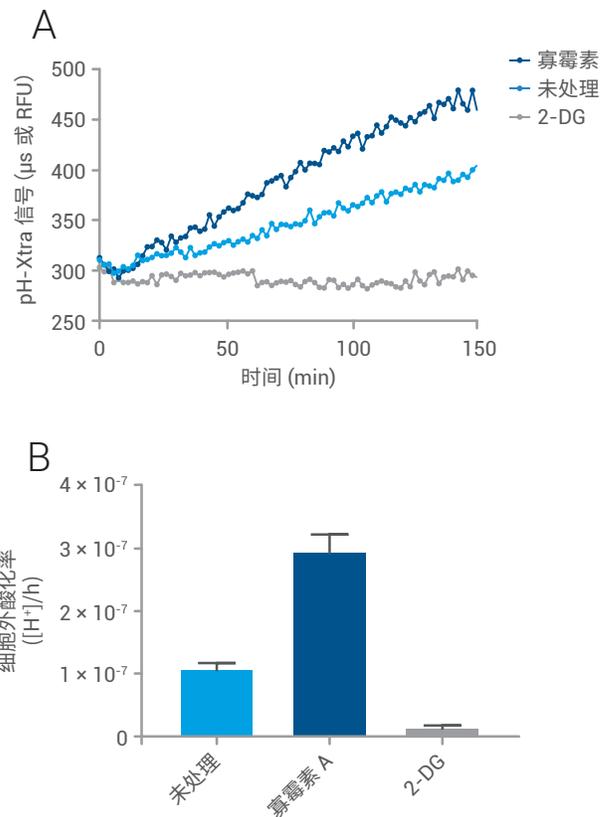


图 7. (A) 利用 Agilent pH Xtra 糖酵解分析测定 A549 糖酵解活性。己糖激酶抑制剂 2-脱氧葡萄糖 (2-DG) 处理抑制了细胞外酸化，观察到探针信号变化减小。使用线粒体 ATP 生成抑制剂寡霉素 A 进行处理，导致糖酵解 ATP 生成增加，以维持细胞能量稳态。(B) 细胞外酸化的变化可以利用 pH 或  $[\text{H}^+]$  离子含量随时间的变化方便地进行评估

# MitoXpress Xtra 和 pH-Xtra 解决方案

## 测量 3D 培养物的细胞代谢

基于酶标仪的细胞代谢测量也可应用于悬浮培养物和特定的 3D 培养体系（例如 RAFT、Mimetix 和 Alvetex）。3D 培养细胞有利于复杂的细胞内相互作用的形成，有助于缩小体外和体内生物体系之间的差异。图 8 显示了如何利用 MitoXpress Xtra 和 pH Xtra 分析测定 3D 基质 (RAFT, Lonza) 中的细胞代谢而不破坏 3D 结构的完整性。

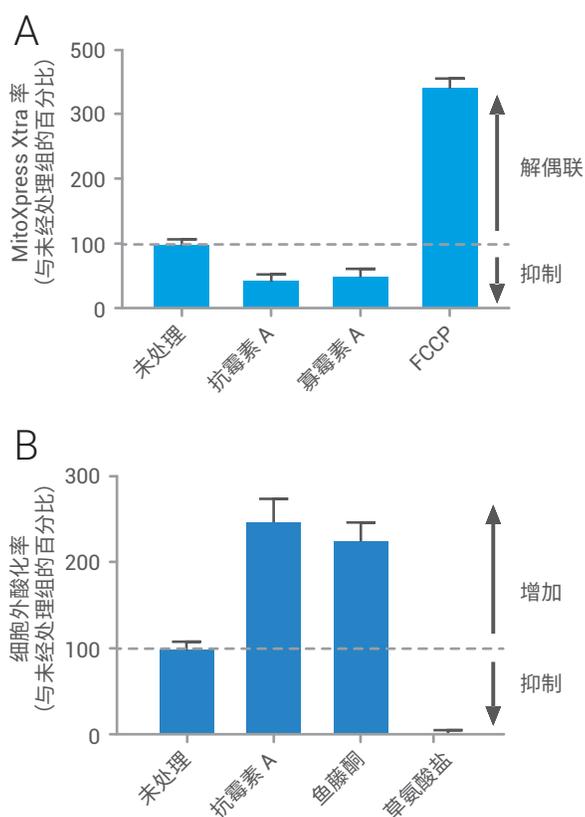


图 8. (A) 利用 Agilent MitoXpress Xtra 分析测定药物处理对 A549 3D RAFT 培养物中耗氧量的相对影响。(B) 利用 Agilent pH Xtra 糖酵解分析测定药物处理对 HepG2 RAFT 培养物的细胞外酸化率的相对影响

## 糖酵解和耗氧量的联合测量

MitoXpress Xtra 和 pH Xtra 的联合使用可以评估细胞代谢平衡以作为后续代谢研究的基线。图 9 展示了如何使用这些联合测量研究一系列细胞类型中耗氧量与糖酵解之间的平衡。该图还展示了改变底物可用性如何调控这种代谢平衡。

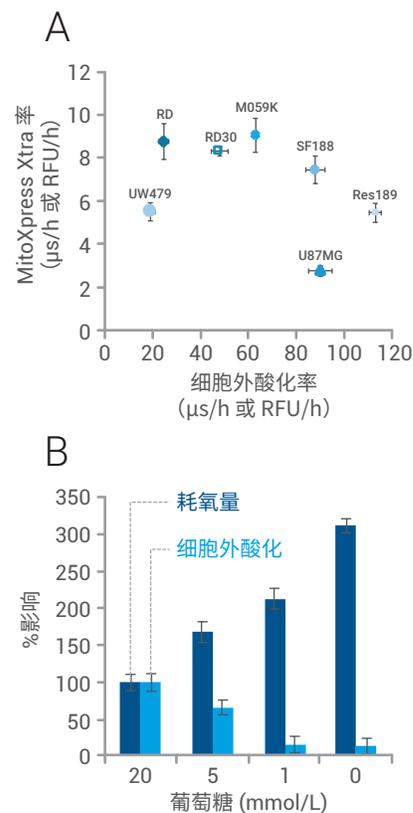


图 9. (A) 利用 Agilent MitoXpress Xtra 和 Agilent pH Xtra 分析对癌细胞系中的糖酵解和线粒体呼吸进行联合分析。(B) 葡萄糖可用性对 U87MG 细胞代谢的影响。葡萄糖可用性增加会导致呼吸降低和糖酵解增加（数据由英国牛津大学 Karl Morten 博士提供）

# MitoXpress Intra 细胞内氧含量分析

## 细胞内氧化和缺氧



细胞水平的氧含量对细胞生理学、信号转导和代谢具有显著影响。因此，更低的生理相关的氧浓度被用于体外研究，特别是癌症代谢、药物发现、神经元和心血管的研究。这类体外模型的关键要素是监测细胞氧化作用的能力，因为这一动态参数的波动可能会扰乱数据解析。因而，了解细胞模型所经受的氧化状态的程度和持续时间非常重要。

MitoXpress Intra 分析试剂盒通过测定活细胞内的  $O_2$  浓度提供了一种解决方案。试剂被细胞吸收，然后可以使用具有双读数时间分辨荧光 (TRF) 测量功能的荧光酶标仪进行监测。探针可以实时响应由环境条件或细胞呼吸变化引起的细胞内氧浓度的任何变化。

除了作为监测工具获取丰富的信息，该分析还可以使研究人员将代谢响应与可用的氧含量联系起来。这些参数在缺血、癌症代谢和缺氧等方面非常重要。图 10 显示了如何利用 MitoXpress Intra 分析揭示细胞所经受的和供应的细胞氧含量之间的显著差异。这些差异取决于细胞数量、增殖、细胞类型和代谢平衡。因此，细胞经受的缺氧程度不能从环境氧浓度进行推断。

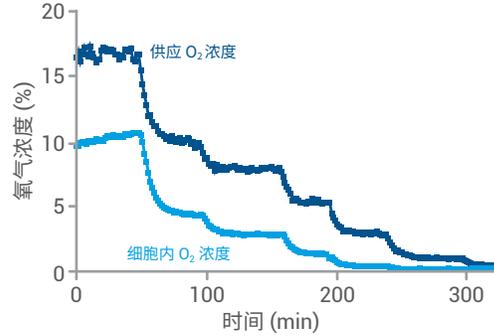


图 10. 在环境  $O_2$  不断降低的条件下，监测 3D 培养物 (RAFT, Lonza) 中生长的 HepG2 细胞中的  $O_2$  浓度。在环境  $O_2$  条件下，细胞经受的平均氧化水平约为 10%，而在环境  $O_2$  为 5% 时，氧化水平接近 0%  $O_2$

这种氧化作用的减少可能具有显著的生理学影响，如果未进行测定，将可能因为缺乏对所研究细胞模型所经受的氧化水平的考虑，导致数据解析出现错误。图 11 进行了举例说明，在约为 1.5%  $O_2$  的细胞氧化水平下观察到 40% 的 HIF 稳定水平。然而，在没有测定氧化作用的情况下，则会假设这种稳定水平与约 5%  $O_2$  的氧含量相关。

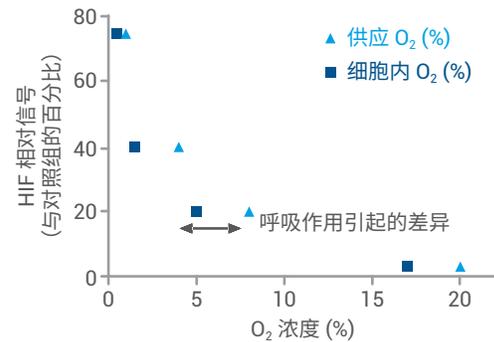


图 11. 在 HT-1080 细胞中利用发光 HIF-报告基因测定 HIF 稳定性，在不断降低的氧浓度下进行监测。HIF 稳定性与供应的氧浓度 (浅蓝色) 和细胞经受的实际氧化水平相关，实际氧化水平利用 Agilent MitoXpress Intra 分析 (深蓝色) 测定。这些数据表明，除非对细胞氧化作用进行测定，否则将对氧的可用性和 HIF 稳定性之间的关系作出错误的结论。(数据由英国牛津大学 Karl Morten 博士提供)

# MitoXpress Intra 解决方案

## 研究缺氧状态下的癌症代谢

利用 MitoXpress Intra 实时监测细胞氧化作用，使研究人员能够准确地确定细胞模型经受的缺氧程度。与 MitoXpress Xtra 分析一样，MitoXpress Intra 可与其他基于酶标仪的分析相结合，包括活力、MMP 和 ROS 的测定。这对癌症代谢研究十分重要，其中缺氧肿瘤环境、代谢灵活性和癌症表型之间的联系具有重要意义。

图 12 展示了一个实例，利用 MitoXpress Intra 和 pH Xtra 糖酵解分析实现细胞氧化和糖酵解活性的多重测定。在缺氧和环境氧条件下进行了测定，数据突出表明了氧化作用对糖酵解活性的影响。

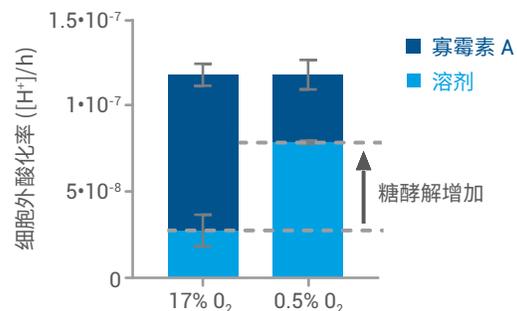
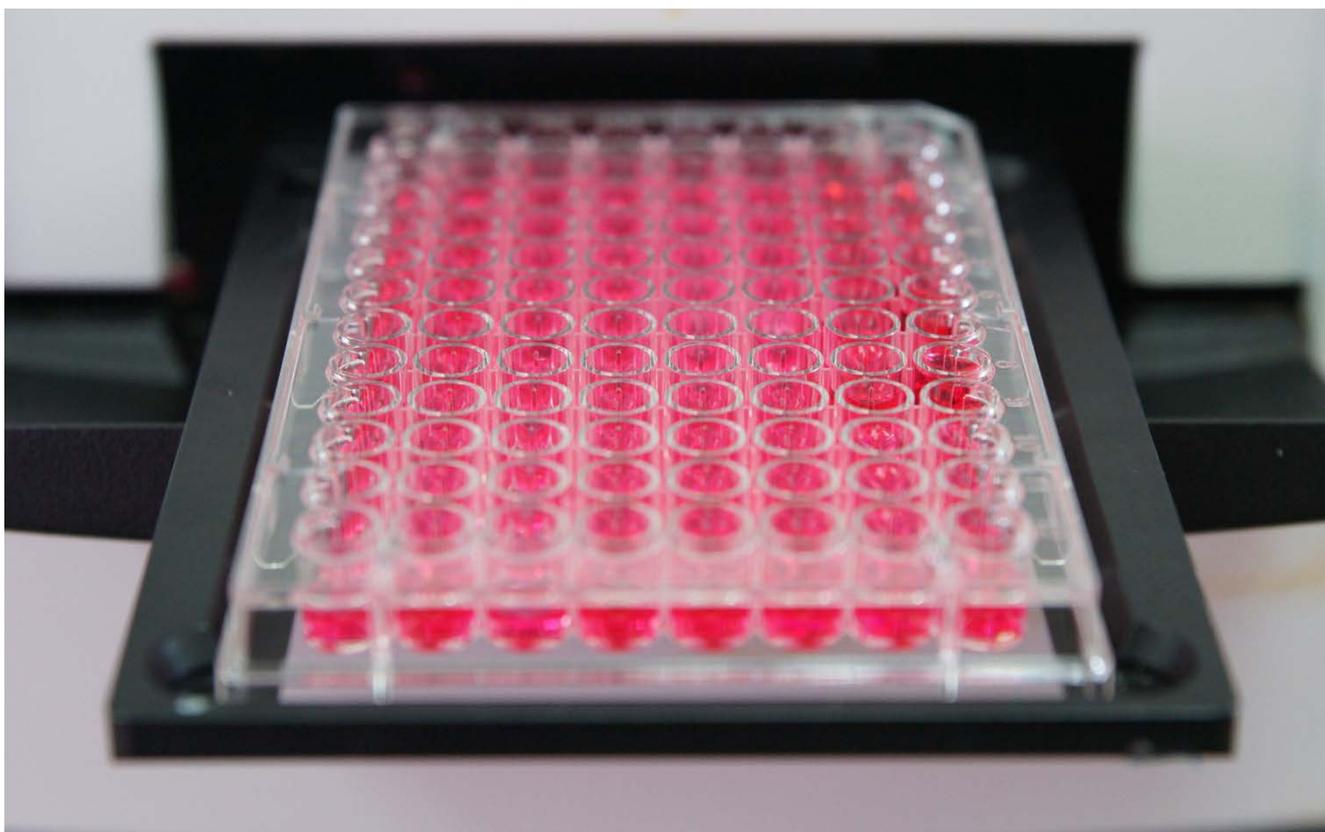


图 12. 利用 Agilent pH Xtra 糖酵解分析测定 A549 细胞的细胞外酸化，利用 Agilent MitoXpress Intra 分析在缺氧状态（由酶标仪的环境控制单元施加）下测定细胞内氧含量水平，从而实现多重测定。溶剂处理的细胞的基础细胞外酸化率在缺氧（浅蓝色）状态下增加约三倍，而用寡霉素（深蓝色，线粒体 ATP 生成的抑制剂）处理后测定的糖酵解能力保持恒定

## 安捷伦优势服务计划

代谢是所有细胞反应的基础，因此也是细胞生物学的核心功能性测量。利用一系列与荧光酶标仪兼容的代谢探针，安捷伦为体外细胞代谢分析提供了全套解决方案。本文展示的应用是利用这些解决方案分析细胞代谢和功能的实例。有关其他资源、更详细的实验方案，或者想要了解安捷伦可溶性代谢探针如何助您回答研究问题，请访问 [www.agilent.com](http://www.agilent.com) 或发送电子邮件至 [cellanalysis.support@agilent.com](mailto:cellanalysis.support@agilent.com) 直接与我们联系。



## 安捷伦细胞分析产品组合

安捷伦行业领先的实时活细胞分析技术帮助研究人员突破了多个研究领域的界限。

如需了解完整的解决方案组合，请访问网站

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

了解更多信息

[www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables)

出版物数据库

[www.agilent.com/publications-database/](http://www.agilent.com/publications-database/)

细胞参考数据库

[www.agilent.com/cell-reference-database/](http://www.agilent.com/cell-reference-database/)

网络研讨会

[www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series](http://www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series)

全球技术支持

[cellanalysis.support@agilent.com](mailto:cellanalysis.support@agilent.com)

免费专线

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

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，2019  
2019年4月16日，中国出版  
5994-0683ZHCN

