

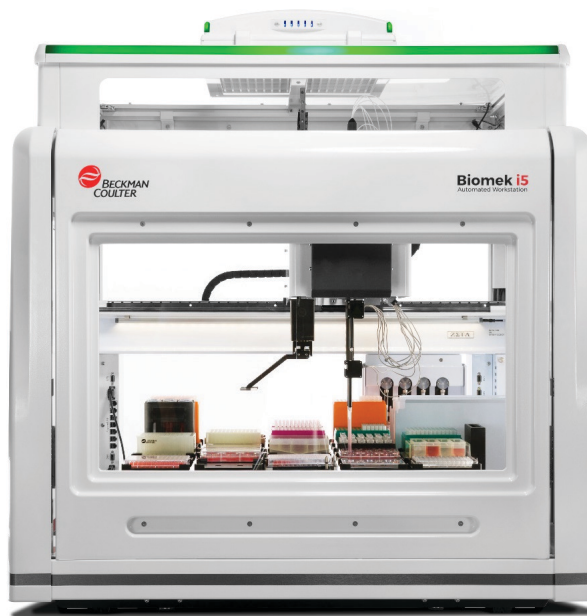
## Автоматизированный анализ посева и роста клеток

### Сводная информация

- Автоматизированное разведение и посев клеток линии CHO
- Подтвержденная согласованность посева и визуализации анализов
- Автоматизированный анализ методом ХТТ для определения линейности по относительному количеству клеток

Применение в клеточных направлениях требует проведения согласованных процессов посева клеток и пробоподготовки, чтобы можно было точно соотнести клеточные изменения с воздействием на клетки в ходе экспериментов. Подтверждение согласованного посева можно получить при визуализации лунок или в ходе суррогатных анализов, в частности, с использованием наборов для анализа жизнеспособности клеток методом ХТТ. Подобные анализы также можно выполнять для обнаружения различий в росте клеток, например, при скрининге цитотоксичности или скрининге для оптимизации среды. Автоматизация может повысить согласованность посева клеток и пробоподготовки, снижая при этом вероятность ошибок. На нижеприведенном рисунке мы демонстрируем, как лабораторная станция Biomek i5 (рисунок 1) применялась для серийного разведения суспензии клеток, посева полученных в результате клеток и их подготовки к анализу методом ХТТ.

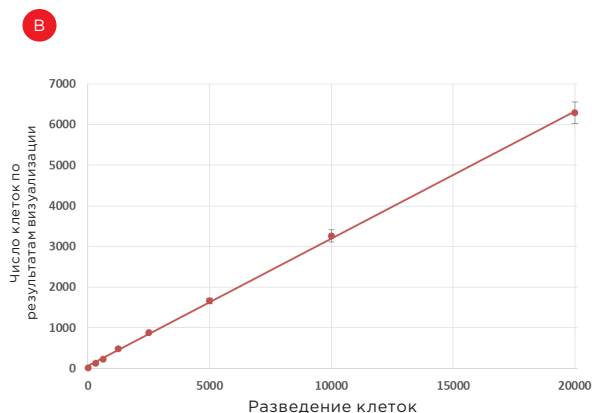
Во избежание загрязнения микроорганизмами крайне важно, чтобы культивирование клеток и проведение анализов осуществлялось в стерильных условиях. В лабораторную станцию закрытого типа Biomek i5 можно добавить воздушный фильтр HEPA (рисунок 1) вместе со стерильными пипеточными наконечниками для поддержания стерильности во время манипуляций с клетками на рабочем столе.



**Рисунок 1.** Лабораторная станция Biomek i5 Span-8, корпуса оборудованы HEPA-фильтрами

Суспензию клеток линии CHO ( $2 \times 10^5$  клеток/мл) добавили в лунку планшета с глубокими лунками и на станции Biomek i5 выполнили последующую серию разведений в соотношении 1 : 2. По 100 мкл получившихся суспензий высевали на планшет с лунками в трех повторностях. Пипетирование было оптимизировано, чтобы предотвратить попадание пузырьков в лунки и гарантировать равномерное распределение клеток и газообмен во всей лунке. Клетки инкубировали при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> в течение 4 ч перед анализом количества клеток на многорежимной платформе SpectraMax® i3x Multi-Mode с применением цитометра SpectraMax MiniMax 300 с возможностью визуализации. На рисунке 2A приведено среднее количество клеток для каждого разведения, а на рисунке 2B изображен график зависимости полученного количества клеток от расчетного количества при посеве. Высокое значение R<sup>2</sup> (0,9996) свидетельствует о согласованности процессов разведения и посева клеток.

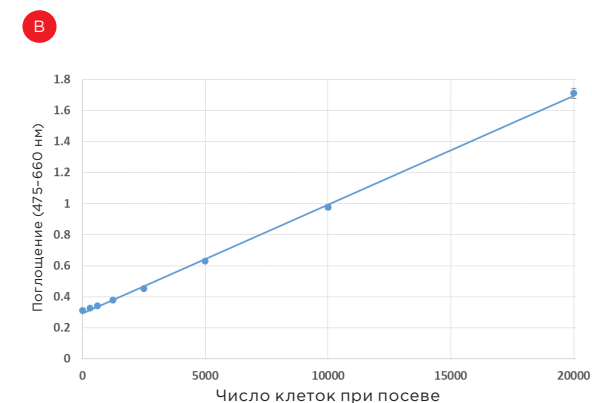
А	Число клеток при посеве	Средн. количество	Коэффициент вариации (CV)
	20 000	6290	4,1 %
	10 000	3264	4,5 %
	5000	1662	4,5 %
	2500	888	2,4 %
	1250	483	7,8 %
	625	237	1,1 %
	313	136	3,0 %



**Рисунок 2.** Число клеток по результатам визуализации. С помощью цитометра SpectraMax MiniMax для каждой лунки в трех повторностях для каждого разведения было получено по четыре светопольных изображения. А) Среднее количество клеток и коэффициент вариации для лунок в трех повторностях. В) График зависимости среднего количества клеток от расчетного количества клеток при посеве. Планки погрешностей на графике соответствуют стандартным отклонениям в трех повторностях. Превосходная линейность ( $R^2 = 0,9996$ ) свидетельствует о согласованных процессах серийного разведения и посева.

По 50 мкл реагента ХТТ добавили в лунки в трех повторностях и поместили обратно в инкубатор на 4 ч. Значения поглощения при 475 нм были получены с помощью платформы SpectraMax i3x Multi-Mode и использованы для определения общего количества клеток в каждой лунке. На рисунке 3А показана согласованность значений количества клеток и добавляемых реагентов в трех повторностях ( $CV < 2\%$ ), а на рисунке 3В приведена линейность ( $R^2 = 0,9991$ ), которая подтверждает согласованное разведение клеток, наблюдаемое при визуализации.

А	Число клеток при посеве	Средн. поглощение	Коэффициент вариации (CV)
	20 000	1,712	1,9 %
	10 000	0,975	1,7 %
	5000	0,630	1,6 %
	2500	0,454	1,9 %
	1250	0,378	0,5 %
	625	0,342	0,8 %
	313	0,325	0,6 %
	0	0,310	1,4 %



**Рисунок 3.** Анализ методом ХТТ. Реагент ХТТ добавляли к клеткам через четыре часа после посева, а затем в течение еще четырех часов проводили инкубацию. А) Средние показания поглощения и коэффициенты вариации (CV) для лунок в трех повторностях. В) График зависимости поглощения от количества клеток при посеве (планки погрешностей = стандартное отклонение). Линейность ( $R^2 = 0,9991$ ) и низкая вариация (коэффициенты вариации  $< 2\%$ ) свидетельствуют о высокой надежности анализа методом ХТТ.

Эта работа демонстрирует способность надежно выполнять посев клеток и анализ их роста методом ХТТ с превосходными показателями согласованности. В случаях применения, требующих повышенной производительности, например при клеточном скрининге, можно использовать прибор Biomek серии i с многоканальной насадкой и (или) интегрировать инкубатор и анализаторы, необходимые для обеспечения полного рабочего процесса.

Автоматизированные лабораторные станции Biomek не предназначены и не утверждены для диагностики заболеваний или других состояний. Данные, представленные в настоящем документе, были получены в процессе разработки.