

# 키네틱 형광 라이브셀 어세이

응용 개요서



# 목차

<b>서론</b>	<b>3</b>
형광 프로브	4
형광 단백질	5
기기	6
<b>키네틱 형광 라이브셀 어세이</b>	<b>7</b>
세포 주기/형광 단백질 융합을 통합하여 세포 주기 단계 감지	7
세포 사멸과 괴사에 대한 키네틱 라이브셀 이미징	9
키네틱 라이브셀 이미징을 사용한 칼슘 이동 특성 확인	11
공동 배양된 세포 모델의 2D 스크래치 상처 치유 분석	13
라이브셀 이미징을 통한 미토콘드리아 역학 모니터링	15
<b>결론</b>	<b>18</b>
<b>참고 문헌</b>	<b>18</b>

# 서론

다양한 조직과 세포 유형으로 구성된 살아있는 유기체는 본질적으로 매우 동적입니다. 따라서 라이브셀 형식의 이미징은 다양한 연구 분야의 실험실에 중요한 도구입니다. 17세기 Antonie van Leeuwenhoek가 살아있는 토끼 귀의 모세혈관에서 혈류를 관찰하기 위해 현미경을 처음 사용한 이후 세포를 연구하는 방법은 많은 변화를 겪었습니다.<sup>1,2</sup> 초기의 수많은 세포 분석은 엔드포인트 실험으로 수행되었으며, 마이크로플레이트 판독 또는 이미징 단계를 수행하여 효과를 확인하기 전에 세포를 지정된 시간 동안 테스트 분자와 함께 배양합니다. 따라하기 쉬운 프로토콜을 제공하지만, 배양 기간이 너무 짧거나 길면 정확한 EC<sub>50</sub> 값(그림 1)으로 표현되는 치료의 실제 효과를 놓칠 수 있습니다.

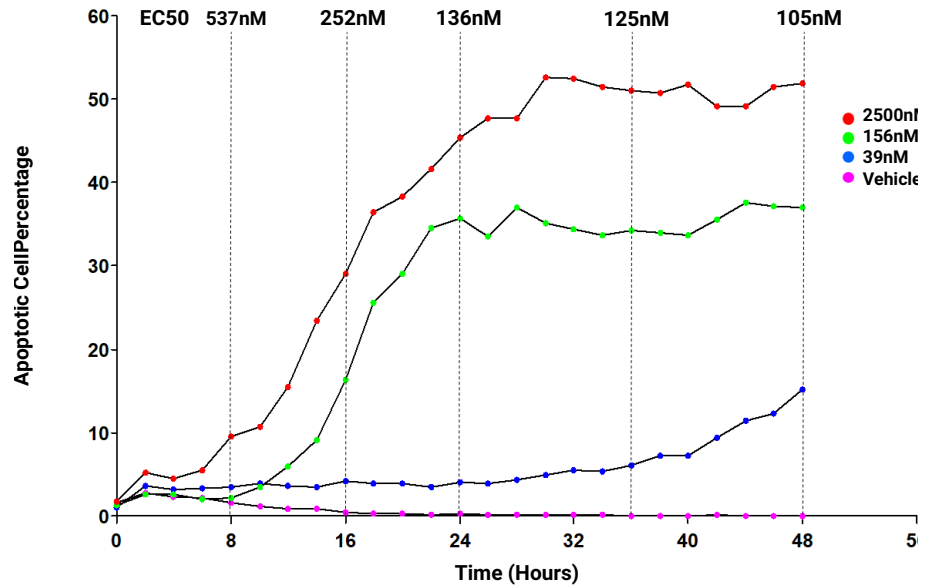


그림 1. HT1080 세포와 함께 배양된 다양한 농도의 캄프토테신에 대한 키네틱 모니터링을 통해 결정된 세포 사멸 세포 비율. 8, 16, 24, 36, 48시간 배양 후 약물의 적정 농도를 확인하기 위한곡선 아래의 각 영역에서 계산된 EC<sub>50</sub> 값.

전체 반응 시간 동안 모니터링 가능한 키네틱 분석을 사용하여 테스트 세포 모델에 대한 치료 효과를 평가하면 더 우수한 결과를 얻을 수 있습니다. 세포 반응에 대한 생물학적으로 관련된 통찰력(그림 1). 시간이 지남에 따라 세포 별 시그널 변화를 검출할 수 있는 것 외에도 키네틱 이미징 분석을 사용하면 세포 형태와 표현형의 변화를 관찰할 수 있습니다. 두 가지 유형의 정보를 결합하면 특정 분자가 세포에 미치는 영향을 완전히 이해할 수 있는 보다 완벽한 접근법이 가능합니다. 키네틱 이미징은 다운스트림의 처리량이 더 높은 엔드포인트 어세이에 통합하기 위한 적절한 배양 시간을 결정하는 데에도 사용할 수 있습니다. 이 기술은 혈행성 내피의 존재 증명<sup>3,4,5</sup>, 사이토카인에 의한 계통 유도 증명<sup>6</sup>, 신경 발생<sup>7,8,9</sup>, 10 및 면역학 분야의 수많은 혁신 등 수많은 발견을 이끌어냈습니다.<sup>11,12,13</sup>

또한, 기존의 형광 현미경 기술과 키네틱 라이브 이미징의 결합은 세포 분석 분석법의 필수적인 부분이 되었습니다. 형광 이미징은 이상적으로는 형광단의 여기 스펙트럼의 피크 근처에 정의된 빛의 파장을 사용하여 형광 분자를 조명하고 더 긴 파장에서 방출되는 빛을 검출함으로써 이루어집니다. 형광 프로브 또는 염료와 같이 일반적으로 사용되는 라이브셀 형광 분자 및 형광 표지된 단백질은 관심 있는 거의 대부분의 세포 과정을 연구할 수 있는 다양한 도구를 제공합니다.

## 형광 프로브

라이브셀 키네틱 이미징에 사용하기 위해 다양한 종류의 형광 프로브가 개발되었습니다. 이는 크게 1) 식별 목적으로 전체 세포 또는 세포 내 구조를 염색하는 프로브, 2) 특정 세포 구조의 변화를 추적하는 프로브, 또는 3) 세포 내의 표현형 변화를 추적하는 프로브로 나눌 수 있습니다.

형광 프로브의 첫 번째 응용은 계수를 위해 전체 세포 또는 세포내 소기관에 표지하도록 설계되었습니다. 예로는 핵, 미토콘드리아 및 리소좀을 각각 표지하는 DRAQ5(Biostatus Limited, Leicestershire, UK), MitoTracker(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 및 Cytopainter(Abcam, Cambridge, UK)와 같은 염료가 있습니다. CellTracker 염료(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)는 쉽게 식별할 수 있도록 전체 세포에 표지합니다.

두 번째 프로브 세트는 특정 세포 소기관의 변화를 추적하는 데 사용됩니다. 이 유형의 프로브가 가장 일반적으로 사용되는 경우는 미토콘드리아 막 전위의 변화를 검출 것입니다. 세포 투과성 TMRE와 같은 프로브는 막 전위가 높은 활성 미토콘드리아에 축적되는 반면, 막 전위가 감소된 탈분극 또는 비활성 미토콘드리아는 TMRE를 격리하지 못합니다.

마지막으로, 세포 사멸, 괴사, 자가포식 및 산화 스트레스와 같은 다양한 표현형 세포 사건을 추적하기 위해 수많은 프로브가 개발되었습니다. 여기서 프로브는 표현형 변화에 반응하여 형광 신호를 생성합니다.

예를 들어, 형광 기반의 세포 사멸 프로브는 포스파티딜세린의 외부 노출과 같은 세포 사멸 단계 동안 존재하는 분자에 결합하거나 카스파제-3에 의한 절단과 같은 이러한 분자에 의해 절단되어 형광 최종 제품을 생성합니다. 프로피듐 요오다이드와 같은 괴사 프로브는 비투과성 세포 염료이므로 괴사 세포의 세포막이 손상된 후에만 염료가 세포에 들어가 세포 핵산과 결합하여 형광 신호를 생성할 수 있습니다.

## 형광 단백질

키네틱 형광 라이브셀 이미징의 대부분은 일반적으로 형광 프로브를 사용하여 수행되지만 유전적으로 암호화된 형광 단백질 태그(형광 단백질)의 통합도 중요한 역할을 합니다. Prasher와 동료들<sup>14</sup>은 *Aequorea victoria*에서 녹색 형광 단백질(GFP)의 복제를 처음 보고하여 2008년 노벨 화학상을 수상했습니다. 지난 수십 년 동안 수십 개의 형광 단백질이 가시 스펙트럼 이미징의 자외선부터 근적외선 범위에 이르는 여기 및 방출 스펙트럼으로 조작되었습니다.<sup>15, 16, 17, 18</sup> 형광 단백질은 다양한 색상 신호를 방출하도록 설계될 수 있을 뿐만 아니라 핵, 핵막 또는 미토콘드리아와 같은 특정 세포내 위치를 표적으로 삼을 수 있습니다. 광범위한 스펙트럼 특성과 위치를 지정하는 능력 덕분에 이러한 단백질은 다중 세포 어세이에 사용하기에 이상적입니다. 다양한 표적 현상과 표현형 현상을 동시에 추적할 수 있기 때문입니다.

키네틱 라이브셀 형광 이미징의 통합은 몇 초, 몇 시간, 며칠 또는 몇 주에 걸쳐 발생할 수 있는 광범위한 세포 현상을 모니터링하는 이상적인 방법을 제공합니다. 이 응용 개요서의 나머지 부분에서는 Agilent BioTek 세포 이미징 및 자동화 기기를 사용하여 다양한 형광 키네틱 라이브셀 어세이 절차를 최적화하고 수행할 수 있는 방법을 설명합니다.

## 기기



### Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경

Lionheart FX 자동화 현미경은 광범위한 이미징 워크플로를 위한 콤팩트하고 포괄적인 현미경 시스템입니다. 최대 60x 에어렌즈, 최대 100x까지 오일 이멀전 배율을 이용 가능하며 형광, 명시야, 컬러 명시야 및 위상 대비 채널을 갖추고 있어 응용 범위가 매우 넓습니다. 40°C 배양, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 제어 및 습도 챔버를 포함한 환경 제어는 키네틱 라이브셀 이미징 응용 분야를 위한 조건을 최적화합니다.



### Agilent BioTek Cytation 7 세포 이미징 멀티모드 리더

Cytation 7 세포 이미징 멀티모드 리더는 자동화 디지털 정립 및 도립 광시야 현미경과 기존의 멀티모드 마이크로플레이트 판독을 결합합니다. 도립 현미경은 형광, 명시야 및 컬러 명시야에서 1.25x-60x 배율의 시료 시각화를 제공합니다. 반사광 이미징 기능이 있는 정립 현미경을 사용하면 ELISpot 또는 빠른 슬라이드 스캐닝 및 ROI 감지 워크플로와 같은 응용이 가능합니다.



### Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더

Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더는 자동화된 디지털 현미경과 기존 마이크로플레이트 검출을 구성 및 업그레이드 가능한 플랫폼에 결합할 수 있습니다. 현미경 모듈은 형광, 명시야, 고대비 명시야, 컬러 명시야 및 위상차 이미징에서 최대 60배율을 제공하며, 65°C까지 온도 제어 및 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 제어를 통해 라이브셀 이미징 워크플로를 용이하게 합니다.



### Agilent BioTek BioSpa 라이브셀 분석 시스템

BioSpa 라이브셀 분석 시스템은 Agilent BioTek 자동화 인큐베이터 및 Agilent BioTek Cytation 이미저로 구성되어 최대 8개의 마이크로플레이트 또는 기타 실험실 장비에서 키네틱 라이브셀 어세이 워크플로를 자동화합니다. 온도 및 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 제어와 습도 모니터링은 라이브셀 이미징 워크플로를 지원합니다. 추가 프로세스 자동화를 위해 액체 처리를 통합할 수 있습니다.



### Agilent BioTek Autoscratch 상처 생성 도구

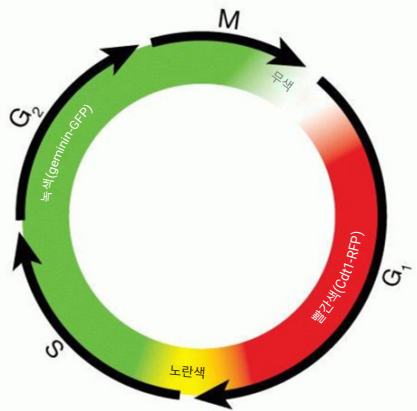
AutoScratch 상처 생성 도구는 마이크로플레이트에서 자란 세포 단층에 재현 가능한 스크래치 상처를 자동으로 생성합니다. 간단한 푸시 버튼 작동과 별도의 도구가 필요 없이 스크래치 핀 매니폴드 교체가 가능하여 세포 migration 및 침습 어세이에 일반적으로 사용되는 96웰 또는 24웰 플레이트를 쉽게 처리할 수 있습니다. 이 소형 시스템은 스크래치 핀에 세포가 쌓이지 않고 오염을 방지하기 위해 사전 프로그래밍 된 세척 기능이 내재되어 있습니다.

# 키네틱 형광 라이브셀 어세이

## 세포 주기/형광 단백질 융합을 통합하여 세포 주기 단계 검출

### 어세이 원리

Premo 형광 유비퀴틴화 세포 주기 지표(FUCCI) 기술(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)은 각각 녹색(emGFP) 및 빨간색(TagRFP) 형광 단백질에 융합된 두 개의 세포 주기 조절 단백질인 geminin과 Cdt1을 기반으로 합니다.<sup>19</sup> Cdt1과 geminin은 세포 주기의 특정 단계에서만 존재하기 때문에 형광 단백질 키메라는 유사하게 의존적입니다. 특정 유비퀴틴 E3 리가제에 의한 유비퀴틴화는 분해를 위해 키메라 구조를 표적으로 삼고 일시적인 활성 조절을 표시하여 세포 주기 동안 geminin과 Cdt1 수준의 순환을 야기합니다. Geminin-GFP는 G1 단계에서 분해되는 반면 Cdt1-TagRFP의 존재는 핵 내에서 빨간색 형광으로 표시됩니다. S, G2 및 M 단계 동안 Cdt1-TagRFP가 분해되고 geminin-GFP만 남아 녹색 형광 핵이 생성됩니다. G1/S 전환 동안 Cdt1 수준이 감소하고 geminin 수준이 증가하면 두 단백질이 모두 존재하여 노란색 형광 핵 신호를 제공합니다. 이러한 주기적 색상 변화(빨간색에서 노란색, 녹색)를 사용하여 세포 주기 및 분열을 통한 진행을 추적할 수 있습니다(그림 2).



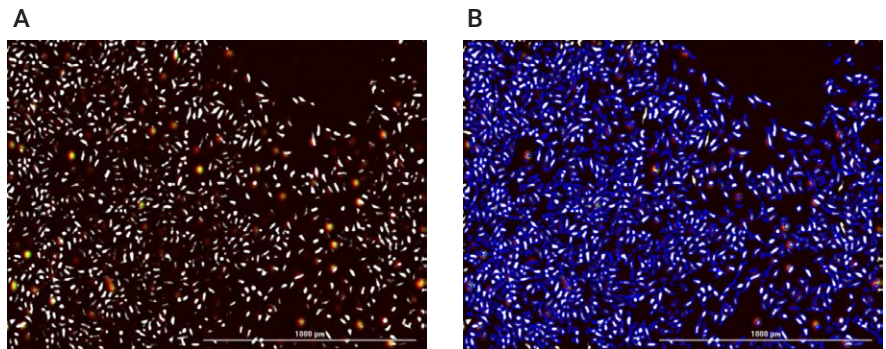
**그림 2.** Premo FUCCI 세포 주기 센서의 역동적인 색상 변화. FUCCI는 라이브셀의 세포 주기 진행과 분열을 나타내는 형광 2색 센서입니다. 세포는 세포 주기의 특정 시점에서 각각 하나의 녹색 및 빨간 형광 단백질에 융합된 geminin과 Cdt1이 발현됨에 따라 G1 단계에서 빨간색, G1/S 간기에서는 노란색, S, G2 및 M 단계에서는 녹색으로 변합니다.

### 분석법 요약

BacMam 2.0을 사용하여 FUCCI 센서로 형질감염시키고 잠재적인 세포 주기 억제제로 처리한 후, 세포는 4x 대물렌즈와 Agilent BioTek 세포 이미저의 고대비 명시야, GFP 및 RFP 이미징 채널을 사용하여 90분마다 이미지를 캡처하여 세포 주기 진행을 키네틱으로 모니터링합니다. 고대비 명시야 채널은 이미지 내의 전체 세포를 캡처하고, GFP 채널은 S, G2 및 M 단계의 세포를 캡처하며, RFP 채널은 G1 및 S 단계의 세포를 캡처합니다.

### 분석 및 결과

캡처 후 모든 이미지는 백그라운드 신호(high background signal)를 제거하기 위해 사전 처리됩니다(그림3A). 그런 다음 고대비 명시야 채널의 신호 변화를 사용하여 1차 개체 마스크가 이미지의 모든 세포 주위에 자동으로 배치됩니다(그림3B).



**그림 3.** 세포 분석을 통해 개체 마스크 적용 전 (A) 및 적용 후(B)에 중첩된 사전 처리된 고대비 명시야, GFP 및 RFP 이미지.

2차 마스크킹 중에 1차 마스크가 확장되어 GFP 및 RFP 신호를 캡처합니다(그림4A). 하위 모집단 분석은 G1 또는 G2/M 단계의 세포를 식별하기 위해 수행되었습니다. RFP 이미징 채널을 사용하여 캡처된 2차 마스크 내의 Cdt1-TagRFP 단백질의 최소 피크 신호가 있는 세포는 G1에 있는 것으로 확인되었고(그림 4B), GFP 이미징 채널을 사용하여 캡처된 2차 마스크 내의 Geminin-GFP 단백질의 최소 피크 신호가 있는 세포는 G2/M 단계에 있는 것으로 확인되었습니다(그림4C). S 단계 동안, 두 세포 주기 융합 단백질이 모두 존재하면 세포는 노란색으로 나타납니다. S 단계로 전환하는 기준을 충족하기 위해 세포는 두 단백질 모두의 최소 피크 신호를 충족해야 합니다(그림 4D).

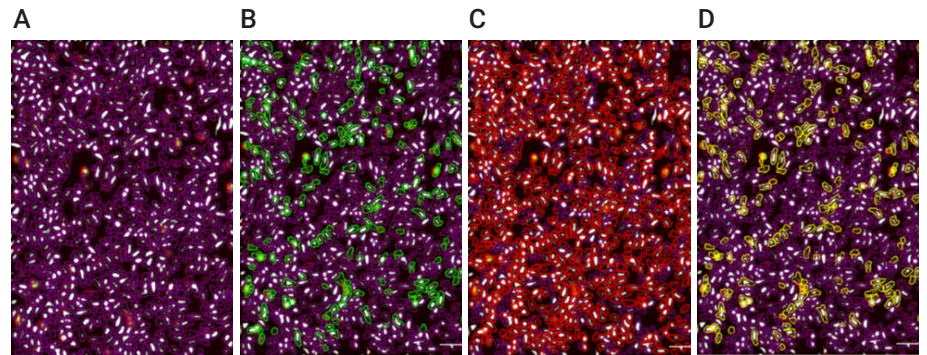


그림 4. (A) 2차 마스크킹 과정에서 확장된 1차 마스크. 그런 다음 피크 RFP 및/또는 GFP 신호를 사용하는 하위 모집단은 (B) G1, (C) G2/M 또는 (D) S 세포 주기 단계에 있는 세포를 식별합니다.

분석 후 배양 기간 동안 각 시점에서 총 G1(빨간색), G2/M(녹색) 및 S(노란색) 세포 계수가 결정됩니다. 최종 빨간색 및 녹색 세포 계수는 이중 계수를 방지하기 위해 초기 결정된 빨간색 또는 녹색 세포 번호에서 노란색 세포를 제거해서 계산됩니다(그림5A). 그런 다음 하위 모집단 세포 계수를 각 시점의 총 세포 값으로 나누어 빨간색, 녹색 및 노란색 세포 비율을 계산합니다(그림5B). 최종 키네틱 플롯은 첨가된 화합물에 의해 달성된 세포 주기 정지 단계를 나타냅니다.

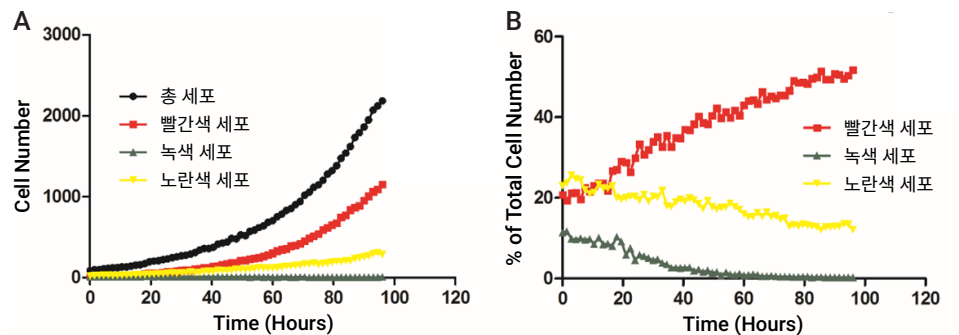


그림 5. (A) 전체, G1(빨간색), G2/M(녹색) 및 S(노란색) 단계 세포에 대해 계산된 키네틱 세포 수. (B) G1에 대한 전체 세포의 백분율, G2/M, S 세포 주기 단계 세포.

### Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Mehta, Sunali, et al. "Dephosphorylation of YB-1 Is Required for Nuclear Localisation During G2 Phase of the Cell Cycle." *Cancers*, vol. 12, no. 2, Jan. 2020, p. 315. Doi: 10.3390/cancers12020315.
2. Van den Berg, Jeroen. Product of the Surrounding: Location Dependent Effects on DNA Double Strand Break Responses. Utrecht University, 2019.

## 세포 사멸과 괴사에 대한 키네틱 라이브셀 이미징

### 어세이 원리

Kinetic Apoptosis Kit(Abcam, Cambridge, UK)는 각각 세포 사멸 및 괴사 세포 활동을 검출하는 두 가지 개별 기술을 기반으로 합니다. pSIVA-IANDB(생존력 및 세포 사멸의 극성 고감도 표시기)는 세포 사멸의 시공간 분석을 위한 Annexin XII 기반 극성 고감도 프로브입니다. 외부 원형질막 포스파티딜세린(PS) 노출은 세포 사멸 초기에 발생하는 특징적인 현상입니다. PS가 외부 막 leaflet으로 이동하면 pSIVA-IANDB가 PS에 결합될 수 있습니다. IANBD 라벨은 IANBD 녹색 형광 신호의 '켜짐'을 야기하는 막의 비극성 지질 환경에 노출됩니다. 앞서 설명한 바와 같이 프로피듐 요오다이드(PI)는 세포 투과성이 없는 형광 투입 괴사 프로브입니다. 괴사 세포의 세포막이 손상된 경우에만 염료가 세포에 들어가 세포 핵산과 결합하여 형광 신호를 생성할 수 있습니다.

### 분석법 요약

pSIVA-IANDB 및 PI 형광 프로브를 각각 10 $\mu$ L/mL 및 5 $\mu$ L/mL의 농도로 배지에 첨가하고 연속 1:4 적정을 통해 10,000-0nM 범위의 캄프토테신의 8-포인트 적정을 생성하는 데 사용했습니다. 이어서, 화합물 및 프로브를 함유하는 배지를 웰당 2000개의 HT-1080 세포를 함유하는 웰에 첨가했습니다. 세포의 세포 사멸 및 괴사 유도를 키네틱으로 모니터링하기 위해 48시간 동안 4x 대물렌즈와 Agilent BioTek 세포 이미저의 고대비 명시야, GFP 및 RFP 이미징 채널을 사용하여 2시간마다 이미지를 캡처했습니다. 고대비 명시야 채널은 이미지 내의 전체 세포를 캡처하고, GFP 채널은 세포 사멸 세포의 녹색 pSIVA-IANDB 신호를 캡처하며, RFP 채널은 괴사 세포의 PI 신호를 캡처합니다.

### 분석 및 결과

캡처 후 모든 이미지를 사전 처리하여 백그라운드 신호(high background signal)를 제거했습니다(그림6A). 그런 다음 고대비 명시야 채널의 신호 변화를 사용하여 1차 개체 마스크가 이미지의 모든 세포 주위에 자동으로 배치됩니다(그림6B).

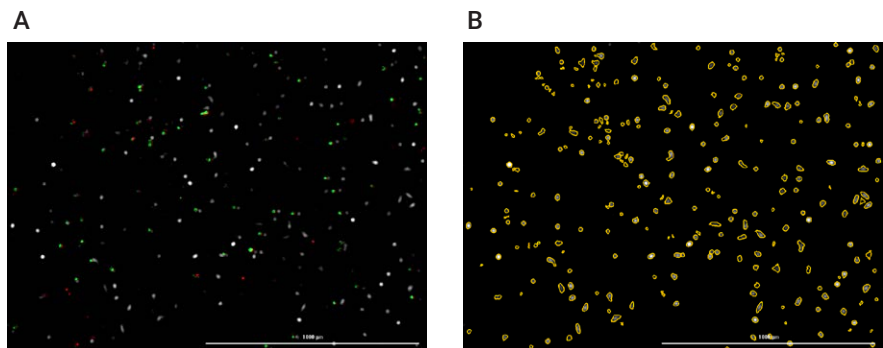


그림 6. (A) 중첩된 사전 처리된 고대비 명시야, GFP 및 RFP 이미지. (B) 세포 분석 중 명시야 신호의 변화를 사용하여 자동으로 적용된 개체 마스크만 보여주는 고대비 명시야 이미지.

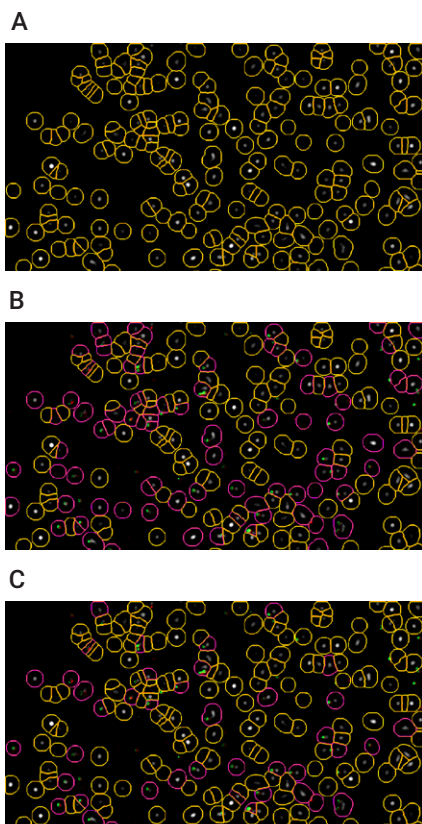
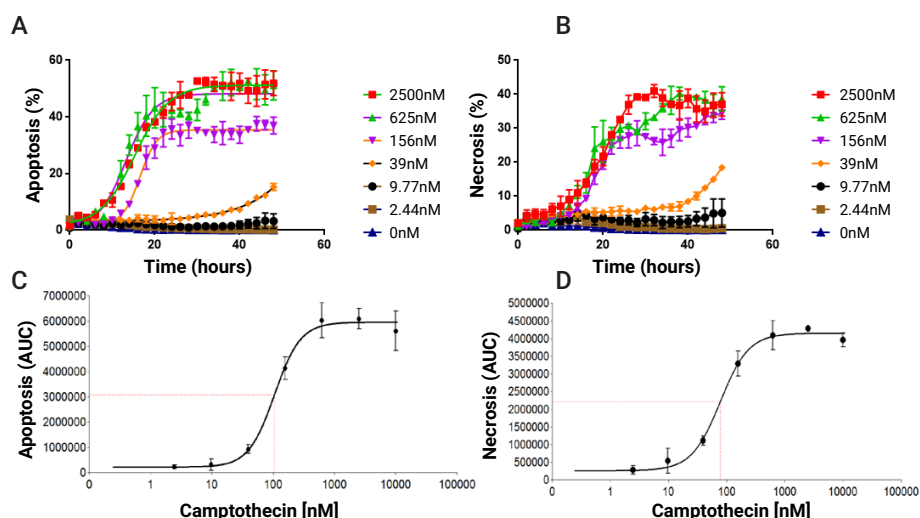


그림 7. (A) 2차 마스크 과정에서 확장된 1차 마스크. 통합 GFP 또는 RFP 신호를 사용하는 하위 모집단이 (B) 세포 사멸 또는 (C) 괴사 세포를 식별합니다.

그림 8. HT-1080 세포에 캄프토테신(2500-0nM)을 48시간 배양한 후 괴사된 후 (A) 세포 사멸; 및 (B) 괴사 세포의 키네틱 백분율. 곡선 값의 아래쪽 면적을 캄프토테신 농도로 플로팅하여 (C) 세포 사멸 또는 (D) 괴사를 유도하는 화합물의 효과를 결정합니다.

2차 마스크 중 1차 마스크가 확장되어 GFP 및 RFP 신호를 캡처합니다(그림 7A). 세포 사멸 또는 괴사 세포 하위 모집단 분석을 확인하기 위해 수행되었습니다. 2차 마스크 내에서 GFP 이미징 채널을 사용하여 캡처된 pSIVAINDB 프로브의 최소 적분 신호가 있는 세포는 세포 사멸인 것으로 확인되었으며(그림 7B), 2차 마스크 내에서 RFP 이미징 채널을 사용하여 캡처된 최소 PI 적분 신호가 있는 세포는 괴사된 것으로 확인되었습니다(그림 7C).

분석 후, 각 시점에서 각 이미지 내의 세포 사멸 및 괴사 세포 백분율은 세포 사멸 또는 괴사 세포 수를 이미지당 계수된 총 세포 수로 나누고 각 값을 백분율로 표시하여 결정됩니다. 이 값을 시간에 따라 플로팅하여 다양한 농도의 테스트 분자(이 경우 캄프토테신)가 세포 모델에서 세포 사멸(그림 8A)과 괴사(그림 8B)를 유도하는 효과를 시각화할 수 있습니다. Agilent BioTek Gen5는 키네틱 플롯을 사용하여 각 키네틱 곡선 아래의 면적을 계산하여 테스트된 캄프토테신 농도에 해당하는 곡선에 대한 하나의 총 면적 값을 생성할 수 있습니다. 그런 다음 이 수치를 캄프토테신 농도와 관련하여 플로팅하여 화합물이 세포 사멸(그림 8C)과 괴사(그림 8D)를 유도하는 능력을 보여주는  $EC_{50}$  값을 생성할 수 있습니다.



### Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Taabazuing, Cornelius Y., et al. "Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages." *Cell Chemical Biology*, vol. 24, no. 4, Apr. 2017, pp. 507-514.e4. Doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.009.
2. Akbarzadeh Khiavi, Mostafa, et al. "PEGylated Gold Nanoparticles-Ribonuclease Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells." *BiolImpacts*, vol. 10, no. 1, July 2019, pp. 27-36. Doi: 10.15171/bi.2020.04.
3. Filali, Samira, et al. "Live-Stream Characterization of Cadmium-Induced Cell Death Using Visible CdTe-QDs." *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, p. 12614. Doi: 10.1038/s41598-018-31077-2.
4. Inde, Zintis, et al. Large-Scale Analysis of Cell Death Phenotypic Heterogeneity. *preprint, Cancer Biology*, 29 Feb. 2020. Doi: 10.1101/2020.02.28.970079.

## 키네틱 라이브셀 이미징을 사용한 칼슘 이동 특성 확인

### 어세이 원리

G 단백질 결합 수용체(GPCR) 활성화 후 세포내 칼슘 저장품의 이동은 세포가 세포간 및 환경 신호에 반응하는 데 중요합니다. 신호 분자가 GPCR에 결합하면  $\alpha$ -서브유닛과  $\beta$ - 및  $\gamma$ -서브유닛 복합체로 구성된 관련 삼량체 GTP 결합 단백질(G 단백질)이 활성화됩니다.  $\alpha$ -서브유닛의 Gs 및 Gq 서브패밀리의 활성화는 세포 내 칼슘 저장품을 세포질로 방출하도록 트리거하며, 이는 칼슘 의존성 단백질을 조절하여 신호를 전파합니다<sup>20</sup>. Fluo-4는 칼슘 수치의 변화를 검출하는 데 광범위하게 사용되는 칼슘 지표입니다. Fluo-4 AM(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)은 세포막을 투과할 수 있는 Fluo-4의 아세톡시메틸 에스테르 유도체입니다. Fluo-4 AM 분자가 세포 내부에 들어가면 비특이적 에스테라제가 친유성 차단 그룹을 절단하여 세포 밖으로 누출될 가능성이 적은 하전된 화합물을 형성합니다. 칼슘이 있는 경우, 유리 Fluo-4는 494/506nm에서 증가된 형광을 나타냅니다.

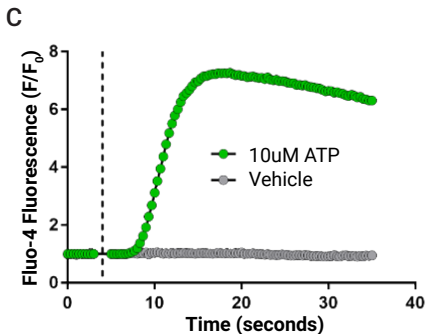
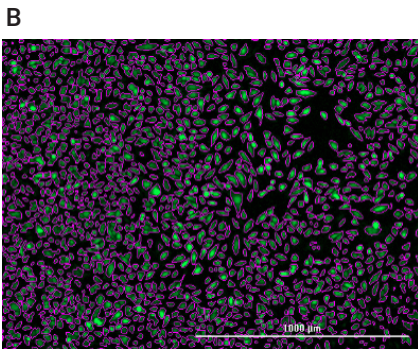
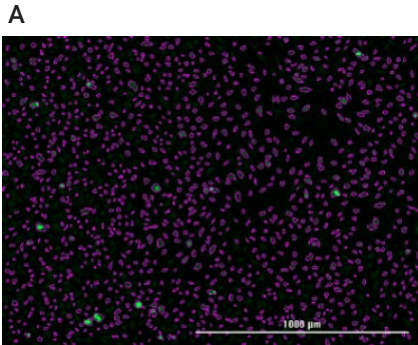


그림 9. (A) 기저 Fluo-4 신호를 사용하여 개체 마스크를 배치한 자극 전 표지된 세포의 4x 이미지. (B) ATP 첨가 후 15초에 개체 마스크 내의 Fluo-4 신호. (C) 키네틱 실험의 전체 길이에 걸친 총 Fluo-4 신호 비율의 키네틱 플롯. 점선은 ATP 주입 시간을 나타냅니다.

### 분석법 요약

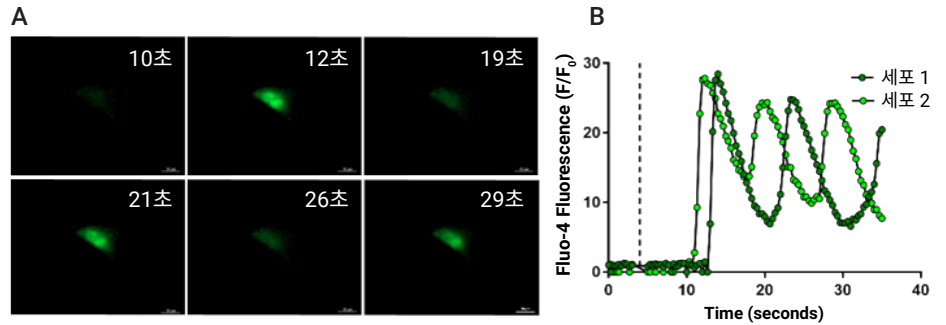
Fluo-4 AM, 4 $\mu$ M을 플레이팅된 세포에 첨가하고 1시간 동안 세포를 투과하게 한 후 통합되지 않은 프로브를 제거하고 DPBS로 교체했습니다. 그런 다음 플레이트를 BioTek 이미저에 삽입하였고 초당 3프레임의 속도로 4x 대물렌즈와 GFP 이미징 채널을 사용하여 키네틱 형광 이미징이 발생했습니다. 베이스라인 이미지는 총 5초 동안 이 속도로 캡처되었습니다. 그 당시 플레이트가 여전히 이미징 위치에 있는 동안 인라인 인젝터를 사용하여 ATP를 최종 농도 10 $\mu$ M로 분주했습니다. 그런 다음 칼슘 신호 전달에 대한 효과를 모니터링하기 위해 추가 30초 동안 동일한 속도로 키네틱 이미징을 시작했습니다.

### 분석 및 결과

캡처 후 모든 이미지를 사전 처리하여 백그라운드 신호(high background signal)를 제거했습니다. GFP 채널에 의해 측정된 배경 위의 염색된 세포의 기저 Fluo-4 신호는 모든 세포 주위에 개체 마스크를 배치하는 데 사용됩니다(그림 9A). 이러한 방식으로 각 세포의 총 Fluo-4 신호는 전체 배양 기간 동안 캡처되고 정량화됩니다(그림 9B). ATP 자극 후 이미지 내 모든 개체의 총 형광을 자극 이전의 기저 신호 이미지의 평균 총 형광으로 나누어 표준화된 상대 형광 비율을 생성합니다. 시간에 따라 플로팅하면 칼슘 이동 수준을 관찰할 수 있습니다(그림 9C).

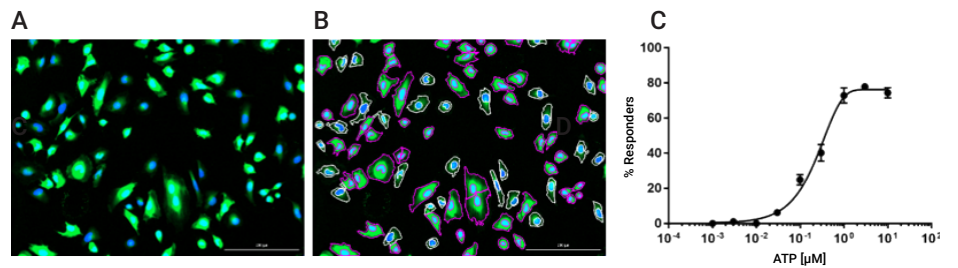
Gen5 세포 분석 중에 이미지의 단일 세포 주위에 플러그를 배치하여 해당 세포의 신호만 키네틱 실험 기간 동안 분석되도록 하면 결과적인 칼슘 흐름(flux)이 개별 세포에 대해 특성 규명될 수 있습니다(그림10A). 이 분석법을 사용하면 세포 내 칼슘 방출 속도와 칼슘 수준의 스파이크 사이의 간격을 높은 주기해상도로 정의할 수 있습니다. 결과적인 활성화 프로파일은 서로 다른 조건에서 또는 서로 다른 세포 유형 간의 세포 반응을 비교하는 데 사용할 수 있습니다(그림 10B).

그림 10. 단일 세포 칼슘 이동 특성. (A) 6개 시점에서 세포 2 주위에 설정된 플러그 이미지. (B) 세포 1과 2는 유사한 활성화 프로파일을 나타냈습니다. ATP 주입(최종 10 $\mu$ M) 후 5-7초 후에 칼슘 이동의 급격한 스파이크가 발생했고(점선), 이어서 칼슘 수치가 다시 스파이킹 되기 전 6-8초에 걸쳐 Fluo-4 형광이 점진적으로 감소했습니다.



Fluo-4 AM(그림 11A) 외에 Hoechst 33342와 같은 핵 염료를 첨가하면 세포당 칼슘 이동을 달성할 수도 있습니다. Gen5는 이미지 내 각 세포의 핵 주위에 1차 마스크를 배치합니다. 그런 다음 2차 마스크는 Fluo-4 프로브의 GFP 캡처 신호 주위에 배치됩니다 (그림 11B). 각 2차 마스크 내의 총 GFP 신호가 정량화됩니다. 이미지 내에서 반응하지 않는 세포를 제거하기 위해 최소 총 신호 값을 사용하여 자극에 반응하는 세포의 수를 Gen5를 통해 반환합니다. Hoechst 33342 염색된 세포를 계산하여 결정된 이미지 내의 총 세포 수로 나누어 응답자 세포 백분율 값을 계산합니다. 그런 다음 칼슘 이동의 효과를 입증하는 치료별 반응 세포의 비율 플롯.

그림 11. (A) Hoechst 33342 및 Fluo-4 염색 세포의 4x 이미지. (B) Hoechst 33342 신호를 사용하는 1차 핵 마스크와 Fluo-4 신호를 사용하는 2차 마스크로 ATP 자극 후 염색된 세포. (C) 칼슘 이동 효과를 입증하는 치료별 반응 세포의 비율 플롯.



### Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Zhou, Wenqing, et al. "Mitofusin 2 Regulates Neutrophil Adhesive Migration and the Actin Cytoskeleton." *preprint, Cell Biology*, 13 Apr. **2019**. Doi: 10.1101/608091.
2. Harlen, Kevin M., et al. "Live-Cell Assays for Cell Stress Responses Reveal New Patterns of Cell Signaling Caused by Mutations in Rhodopsin,  $\alpha$ -Synuclein and TDP-43." *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 13, Dec. **2019**, p. 535, Doi: 10.3389/fncel.2019.00535.
3. Jeon, Bo-Hui, et al. "Dexamethasone Treatment Increases the Intracellular Calcium Level Through TRPV6 in A549 Cells." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 3, Feb. **2020**, p. 1050. Doi: 10.3390/jms21031050.

## 공동 배양된 세포 모델의 2D 스크래치 상처 치유 분석

### 어세이 원리

상처 치유 또는 스크래치 분석은 세포 이동을 측정하는 간단하고 널리 사용되는 방법입니다. 이 분석법에서는 배양된 세포가 컨플루언스에 도달하면 단일층에 기계적으로 스크래치가 만들어져 무세포 구역(cell-free zone)이 생성되고 일부 세포 모델의 경우 상처 영역을 시뮬레이션합니다. 무세포 구역의 집단 세포 이동은 시간이 지남에 따라 키네틱으로 이미징되어 억제되지 않거나 테스트 분자의 영향을 받을 때 세포 이동의 특성을 규명합니다. 섬유아세포와 같은 기질 세포는 ECM의 성분을 침착시키는 역할을 하며 고형 종양 미세 환경에서 이동, 침습 및 기타 종양 형성 과정에 암세포에 영향을 줍니다.<sup>21</sup> 체내에서 기질이 중요한 역할을 하기 때문에 생성된 데이터의 관련성을 높이기 위해 체외 세포 이동 연구를 수행할 때 표적 암세포 외에 이러한 세포를 포함시켜야 합니다. 각 공동 배양 세포 유형이 별도의 형광 단백질을 발현하도록 함으로써 공동 배양 세포 모델 내에서 개별 상대 키네틱 상처 치유 속도를 쉽게 이미징하고 분석합니다.

### 분석법 요약

GFP 발현 U-87 교모세포종과 RFP 발현 원발성 섬유아세포를  $3.0 \times 10^5$  세포/mL의 농도로 희석하고 1:1 비율로 혼합하여 96웰 플레이트의 웰에 첨가했습니다. 합류 세포 단일층을 생성하기 위해 부착한 후, 플레이트는 로봇 팔의 핀이 각 웰의 세포층 내에 일관된 무세포 구역(스크래치)을 생성하는 AutoScratch 도구로 옮겨졌습니다. 그런 다음 대기 조건을  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 로 미리 설정한 상태에서 BioSpa 8에 플레이트를 넣었습니다. BioSpa 8 소프트웨어는 테스트 웰의 형광 이미징을 위해 플레이트가 자동으로 Cytation 5로 옮겨지도록 프로그래밍되었습니다. 단일 4x 이미지를 GFP 및 RFP 채널로 촬영하여 U-87 및 섬유아세포 세포가 각각 원래 상처 부위로 이동할 수 있는 가능성을 포착했습니다. 그런 다음 플레이트를 BioSpa 8로 다시 옮기고 키네틱 이미징 주기를 총 48시간 동안 90분마다 반복했습니다.

### 분석 및 결과

캡처 후 키네틱 형광 이미지를 사전 처리하여 백그라운드 신호(high background signal)를 제거했습니다(그림 12).

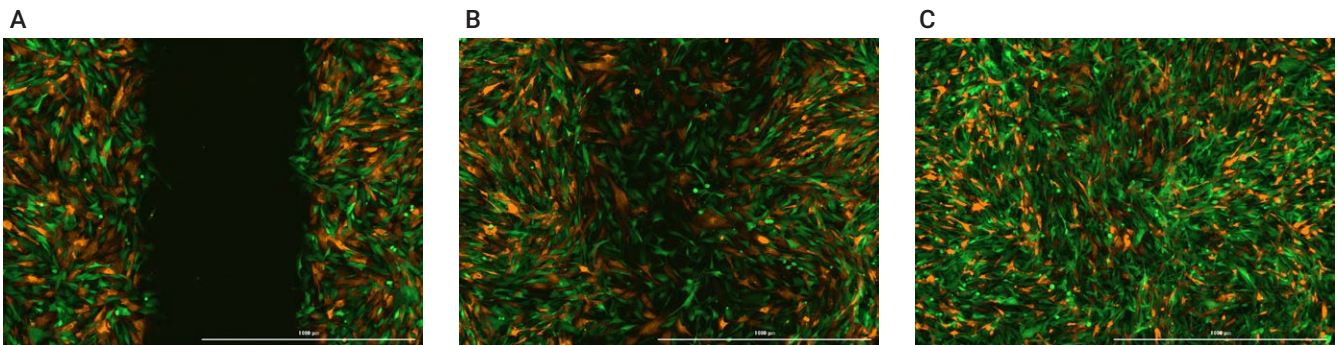


그림 12. 섬유아세포와 U-87 공동 배양 상처 치유의 형광 이미지. (A) 0, (B) 18 및 (C) 48시간 배양 후 억제되지 않은 RFP 발현 섬유아세포 및 GFP 발현 U-87 세포 이동이 캡처된 키네틱 이미지.

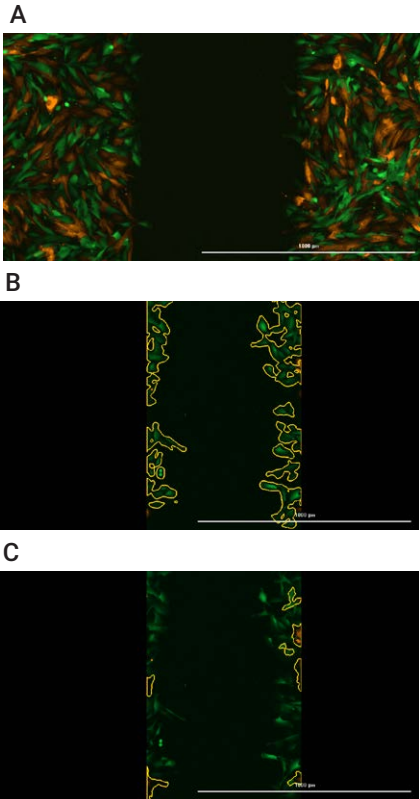


그림 13. 생성된 상처 내에서 공동 배양된 개별 세포 유형의 세포 분석. (A) 상처 생성 직후 RFP 발현 섬유아세포와 GFP 발현 U-87 세포의 중첩된 형광 이미지. (B) 3시간 배양 후 U-87 세포로부터의 GFP 신호에 대한 세포 분석. (C) 3시간 배양 후 섬유아세포로부터의 RFP 신호에 대한 세포 분석.

그런 다음 포함된 각 세포의 이동 특성을 평가하기 위해 두 가지 별도의 세포 분석 단계를 수행했습니다. 그러나 섬유아세포나 U-87 세포 모두 생성된 상처의 양쪽에 합류 단일층을 형성하지 않기 때문에 새로운 분석법이 도입되었습니다. 분석 단계에서는 AutoScratch로 생성된 상처의 왼쪽과 오른쪽 영역을 덮는 이미지 플러그를 적용하여 무세포 구역만 남겼습니다. 이런 방식으로 U-87 또는 섬유아세포 세포가 이미지의 개방되고 노출되지 않은 영역으로 이동하는 것만을 각각 GFP 또는 RFP 신호의 변화를 사용하여 분석했습니다(그림 13).

그런 다음 Gen5는 원래 상처 영역 내에서 정규화된 세포 비율 또는 상처 컨플루언스 값을 자동으로 계산합니다. 그런 다음 키네틱 상처 컨플루언스 곡선을 플로팅하여 공동 배양된 세포 모델의 세포 이동 패턴 간의 가능한 차이를 확인합니다(그림 14). 상처 생성 후 처음 6시간 동안의 두 키네틱 곡선을 비교했을 때(그림 14B), Gen5가 해당 시간 동안 최대 상처 치유 속도를 생성한 것 외에도, 특히 처음 4시간 동안 상대적으로 낮은 이동 속도를 보인 섬유아세포( $122\mu\text{m}^2/\text{분}$ )에 비해 U-87 교묘세포종 세포의 초기 이동 속도 ( $404\mu\text{m}^2/\text{분}$ )가 높았음을 알 수 있습니다.

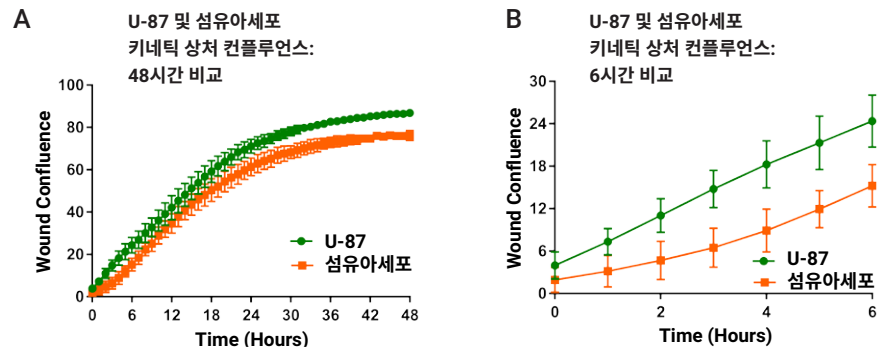


그림 14. 공동 배양된 세포 모델의 억제되지 않은 세포 이동 곡선. GFP 발현 U-87 세포 및 RFP 발현 섬유아세포에 대한 키네틱 상처 컨플루언스 곡선. (A) 48시간 및 (B) 6시간 배양에 대한 곡선.

### Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

- Chen, Xuenan, et al. "Panax ginseng total protein promotes proliferation and secretion of collagen in NIH/3T3 cells by activating extracellular signal-related kinase pathway." *Journal of Ginseng Research*, 1 Mar. **2017**.  
Doi: 10.1016/j.jgr.2017.02.001.
- Nanayakkara, Amila K., et al. "Prolonged Inhibition of P-Glycoprotein after Exposure to Chemotherapeutics Increases Cell Mortality in Multidrug Resistant Cultured Cancer Cells." *PLOS ONE*, edited by Jed N. Lampe, vol. 14, no. 6, June **2019**, p. e0217940. Doi: 10.1371/journal.pone.0217940.
- Sultan, Ahmed S., et al. "Evaluation of the Antifungal and Wound-Healing Properties of a Novel Peptide-Based Bioadhesive Hydrogel Formulation." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 63, no. 10, July **2019**, pp. e00888-19, /aac/63/10/AAC.00888-19.atom. Doi: 10.1128/AAC.00888-19.

## 라이브셀 이미징을 통해 미토콘드리아 역학 모니터링

### 어세이 원리

세포 투과성 MitoTracker 프로브에는 미토콘드리아 표지를 위한 약간의 티올 반응성 클로로메틸 부분이 포함되어 있습니다. MitoTracker Red CMXRos는 세포막을 쉽게 통과하여 건강하고 활동적인 미토콘드리아에 축적되는 빨간색 형광 염료입니다. 미토콘드리아 막이 탈분극되거나 비활성화되면 염료가 세포 전체로 확산되어 신호 감소가 나타납니다.

### 분석법 요약

HT-1080 세포를 절반 영역의 96웰 플레이트에 첨가하고 부착되도록 했습니다. 그런 다음 세포를 10 $\mu$ M Hoechst 33342 및 100nM MitoTracker Red CMXRos로 20분 동안 염색했습니다. 그런 다음 플레이트를 Agilent BioTek 이미저에 삽입하여 40x 대물렌즈, Hoechst 33342 프로브의 신호를 캡처하는 DAPI 이미징 채널, MitoTracker 프로브의 신호를 캡처하는 Texas Red 채널을 사용하여 처리 전에 단일 초기 이미지를 캡처했습니다. 그런 다음 이미저에서 플레이트를 제거하고 세척하여 세포에 흡수되지 않은 염료를 제거했습니다. 연속적인 1:3 희석을 사용하여 10-0 $\mu$ M 범위의 FCCP 적정액을 웰에 추가하고 플레이트를 다시 이미저에 넣고 40x 대물렌즈와 DAPI 및 Texas Red 이미징 채널을 사용하여 5분마다 다시 키네틱 형광 이미징을 실시했습니다.

### 분석 및 결과

캡처 후 키네틱 형광 이미지를 사전 처리하여 백그라운드 신호(high background signal)를 제거했습니다(그림 15).

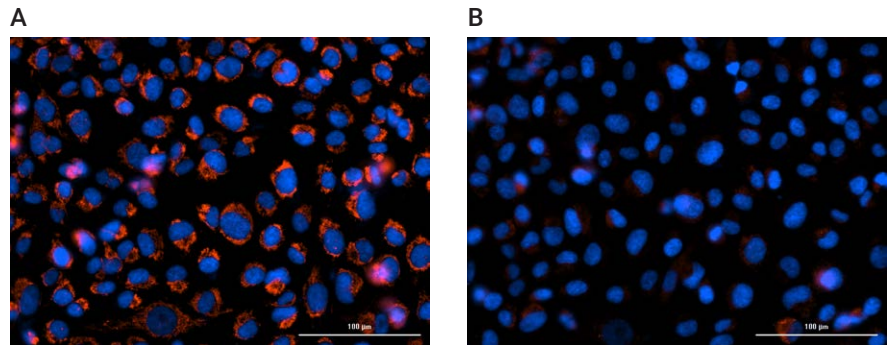


그림 15. 각각 Hoechst 33342 핵 및 MitoTracker 프로브 신호를 캡처한 1시간 10 $\mu$ M FCCP 처리 전(A) 및 후(B)에 중첩된 사전 처리된 DAPI 및 텍사스 레드 이미지.

그런 다음 DAPI 채널의 신호 변화를 사용하여 1차 개체 마스크가 이미지의 모든 세포 주위에 자동으로 배치되었습니다(그림 16). 1차 개체 마스크는 DAPI 채널을 사용하여 모든 세포 핵 주위에 자동으로 배치되었습니다.

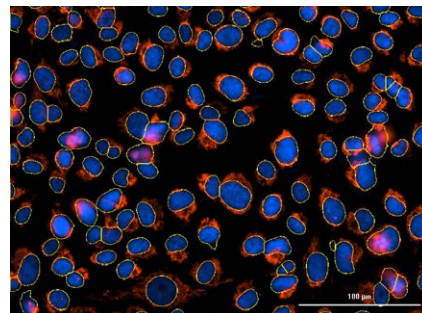


그림 16. 중첩된 사전 처리된 DAPI 세포 분석 중 DAPI 신호의 변화를 사용하여 자동으로 적용되는 1차 개체 마스크를 보여주는 Texas Red 이미지.

그런 다음 1차 마스크에서 확장되어 Texas Red 이미징 채널을 사용하여 캡처한 MitoTracker 프로브를 포함하는 2차 마스크가 생성되었습니다. (그림 17A). 강력한 이온 투과 담체 및 미토콘드리아성 언커플러인 FCCP를 첨가하면 미토콘드리아 탈분극으로 인해 MitoTracker 신호가 손실됩니다. 모든 키네틱 이미지 분석에 동일한 델타 신호 임계값 기준이 사용되기 때문에 10 $\mu$ M FCCP로 1시간 처리한 후 2차 마스크 영역이 극적으로 감소합니다(그림 17B).

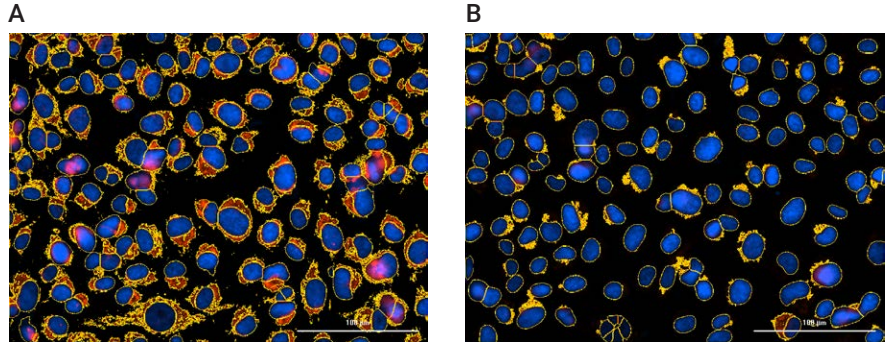


그림 17. 1시간 10 $\mu$ M FCCP (A) 처리 전과 (B) 처리 후의 1차 및 2차 개체 마스크 배치를 보여주는 중첩된 사전 처리된 DAPI 및 텍사스 레드 이미지.

그런 다음 Gen5를 사용하여 원래 평균 영역 범위에 대한 키네틱에서 각 시점의 평균 영역 범위의 비율을 생성할 수 있습니다. 시간에 따라 그래프를 그리면 FCCP의 농도가 미토콘드리아 분극화에 미치는 영향이 분명해집니다(그림 18).

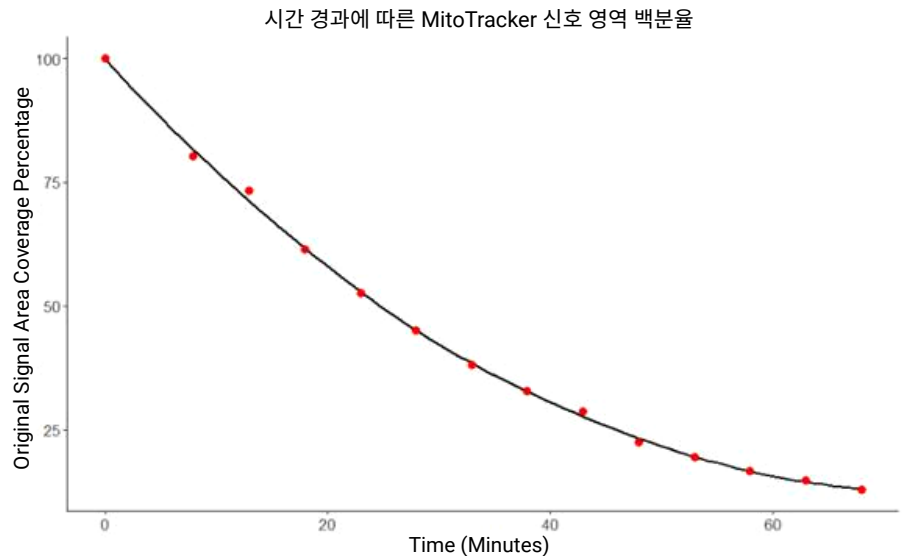


그림 18. 10 $\mu$ M FCCP 치료 동안 키네틱 정규화 평균 MitoTracker 신호 적용 범위 그래프.

마지막으로, 이전에 설명한 대로 Gen5는 키네틱 곡선 아래 면적을 계산하여 테스트된 FCCP의 각 농도에 해당하는 곡선에 대한 하나의 총 면적 값을 생성할 수 있습니다. 그런 다음 이 수치를 FCCP 농도와 연관시켜 플로팅하여 4.2 $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 생성해 화합물의 미토콘드리아 분극화를 방해하는 능력을 입증할 수 있습니다(그림 19).

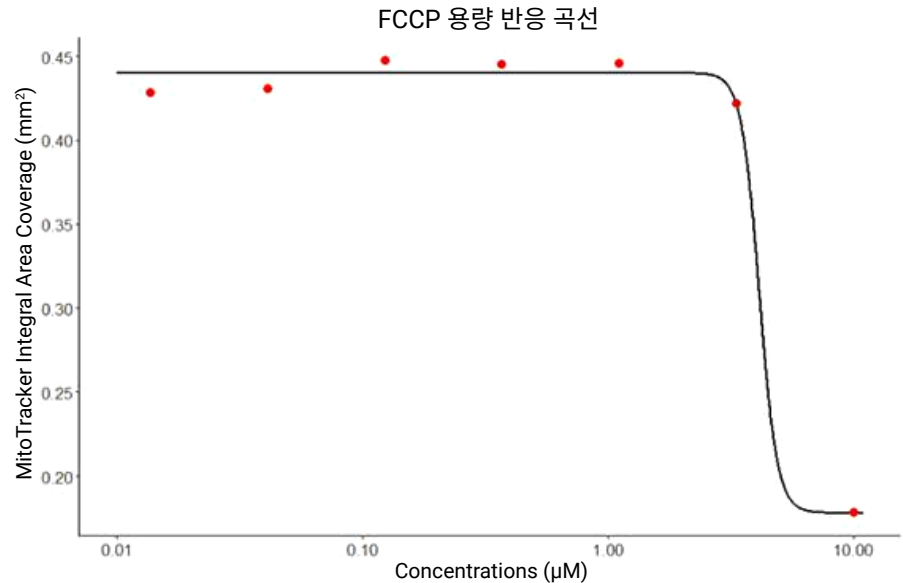


그림 19. 미토콘드리아 분극화에 대한 복합 효과를 결정하기 위해 FCCP 농도에 대해 플로팅된 곡선 값 아래 면적의 그래프.

### Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Martins, A. D., et al. "Ghrelin Acts as Energy Status Sensor of Male Reproduction by Modulating Sertoli Cells Glycolytic Metabolism and Mitochondrial Bioenergetics." *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 434, Oct. **2016**, pp. 199–209. Doi: 10.1016/j.mce.2016.07.008.
2. Di Cristo, Francesca, et al. "Meldonium Improves Huntington's Disease Mitochondrial Dysfunction by Restoring Peroxisome Proliferator activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  Expression." *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 6, June **2019**, pp. 9233–46. Doi: 10.1002/jcp.27602.
3. Chen, Zongyan, et al. "The Roles of Mitochondria in Radiation-Induced Autophagic Cell Death in Cervical Cancer Cells." *Tumor Biology*, vol. 37, no. 3, Mar. **2016**, pp. 4083–91. Doi: 10.1007/s13277-015-4190-8.

## 결론

세포 소기관 기반 또는 표현형 프로브 또는 형광 단백질을 사용하여 여러 가지 라이브셀 키네틱 형광 분석을 시연했습니다. 각 분석 워크플로는 Agilent BioTek BioSpa 및 Agilent BioTek AutoScratch를 포함한 Agilent BioTek 이미징 기기 및 자동화를 통해 쉽게 자동화할 수 있습니다. 키네틱 분석 화학물질과 자동화된 기기를 결합하면 다양한 연구 응용 분야에서 정확하고 재현성 있는 고품질 결과를 생성할 수 있습니다.

## 참고 문헌

1. Dunn, Graham A., and Gareth E. Jones. "Cell Motility under the Microscope: Vorsprung Durch Technik." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, no. 8, Aug. **2004**, pp. 667–72. Doi: 10.1038/nrm1439.
2. Frischknecht, Freddy, et al. "Retrospective: Birth of the Cool - Imaging and Microbiology from Ibn al-Haytham to Jean Comandon." *Biotechnology Journal*, vol. 4, no. 6, June **2009**, pp. 787–90. Doi: 10.1002/biot.200900102.
3. Bertrand, Julien Y., et al. "Haematopoietic Stem Cells Derive Directly from Aortic Endothelium during Development." *Nature*, vol. 464, no. 7285, Mar. **2010**, pp. 108–11. Doi: 10.1038/nature08738.
4. Eilken, Hanna M., et al. "Continuous Single-Cell Imaging of Blood Generation from Haemogenic Endothelium." *Nature*, vol. 457, no. 7231, Feb. **2009**, pp. 896–900. Doi: 10.1038/nature07760.
5. Kissa, Karima, and Philippe Herbomel. "Blood Stem Cells Emerge from Aortic Endothelium by a Novel Type of Cell Transition." *Nature*, vol. 464, no. 7285, Mar. **2010**, pp. 112–15. Doi: 10.1038/nature08761.
6. Rieger, Michael A., et al. "Hematopoietic Cytokines Can Instruct Lineage Choice." *Science*, vol. 325, no. 5937, July **2009**, pp. 217–18. Doi: 10.1126/science.1171461.
7. Asami, Maki, et al. "The Role of Pax6 in Regulating the Orientation and Mode of Cell Division of Progenitors in the Mouse Cerebral Cortex." *Development*, vol. 138, no. 23, Dec. **2011**, pp. 5067–78. Doi: 10.1242/dev.074591.
8. Costa, Marcos R., et al. "Par-Complex Proteins Promote Proliferative Progenitor Divisions in the Developing Mouse Cerebral Cortex." *Development*, vol. 135, no. 1, Nov. **2007**, pp. 11–22. Doi: 10.1242/dev.009951.
9. Costa, Marcos R., et al. "Late Origin of Glia-Restricted Progenitors in the Developing Mouse Cerebral Cortex." *Cerebral Cortex*, vol. 19, no. suppl\_1, July **2009**, pp. i135–43. Doi: 10.1093/cercor/bhp046.

10. Costa, Marcos R., et al. "Continuous Live Imaging of Adult Neural Stem Cell Division and Lineage Progression in Vitro." *Development*, vol. 138, no. 6, Mar. **2011**, pp. 1057–68. Doi: 10.1242/dev.061663.
11. Henrickson, Sarah E., et al. "T Cell Sensing of Antigen Dose Governs Interactive Behavior with Dendritic Cells and Sets a Threshold for T Cell Activation." *Nature Immunology*, vol. 9, no. 3, Mar. **2008**, pp. 282–91. Doi: 10.1038/ni1559.
12. Junt, Tobias, et al. "Subcapsular Sinus Macrophages in Lymph Nodes Clear Lymph-Borne Viruses and Present Them to Antiviral B Cells." *Nature*, vol. 450, no. 7166, Nov. **2007**, pp. 110–14. Doi: 10.1038/nature06287.
13. Sung, Jung Hwan, et al. "Chemokine Guidance of Central Memory T Cells Is Critical for Antiviral Recall Responses in Lymph Nodes." *Cell*, vol. 150, no. 6, Sept. **2012**, pp. 1249–63. Doi: 10.1016/j.cell.2012.08.015.
14. Prasher, Douglas C., et al. "Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-Fluorescent Protein." *Gene*, vol. 111, no. 2, Feb. **1992**, pp. 229–33. Doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-H.
15. Ai, Hui-wang, et al. "Exploration of New Chromophore Structures Leads to the Identification of Improved Blue Fluorescent Proteins †." *Biochemistry*, vol. 46, no. 20, May **2007**, pp. 5904–10. Doi: 10.1021/bi700199g.
16. Cubitt, Andrew B., et al. "Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 11, Nov. **1995**, pp. 448–55. Doi: 10.1016/S0968-0004(00)89099-4.
17. Heim, Roger, and Roger Y. Tsien. "Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer." *Current Biology*, vol. 6, no. 2, Feb. **1996**, pp. 178–82. Doi: 10.1016/S0960-9822(02)00450-5.
18. Zhang, Jin, et al. "Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 12, Dec. **2002**, pp. 906–18. Doi: 10.1038/nrm976.
19. Sakaue-Sawano, Asako, et al. "Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression." *Cell*, vol. 132, no. 3, Feb. **2008**, pp. 487–98. Doi: 10.1016/j.cell.2007.12.033.
20. Hepler, John R., and Alfred G. Gilman. "G Proteins." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 17, no. 10, Oct. **1992**, pp. 383–87. Doi: 10.1016/0968-0004(92)90005-T.
21. Rajaram, Megha, et al. "System-Wide Analysis Reveals a Complex Network of Tumor-Fibroblast Interactions Involved in Tumorigenicity." *PLoS Genetics*, edited by Marshall S. Horwitz, vol. 9, no. 9, Sept. **2013**, p. e1003789. Doi: 10.1371/journal.pgen.1003789.

더 알아보기:

[www.agilent.com/lifesciences/biotek](http://www.agilent.com/lifesciences/biotek)

Agilent Community:

[community.agilent.com](http://community.agilent.com)에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요.

온라인 구매:

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

미국 및 캐나다

**1-800-227-9770**

[agilent\\_inquiries@agilent.com](mailto:agilent_inquiries@agilent.com)

유럽

[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)

아시아 태평양

[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.  
RA44173.6629282407

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
2021년 2월 1일, 한국에서 발행  
5994-2567KO  
AG052920\_01

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

