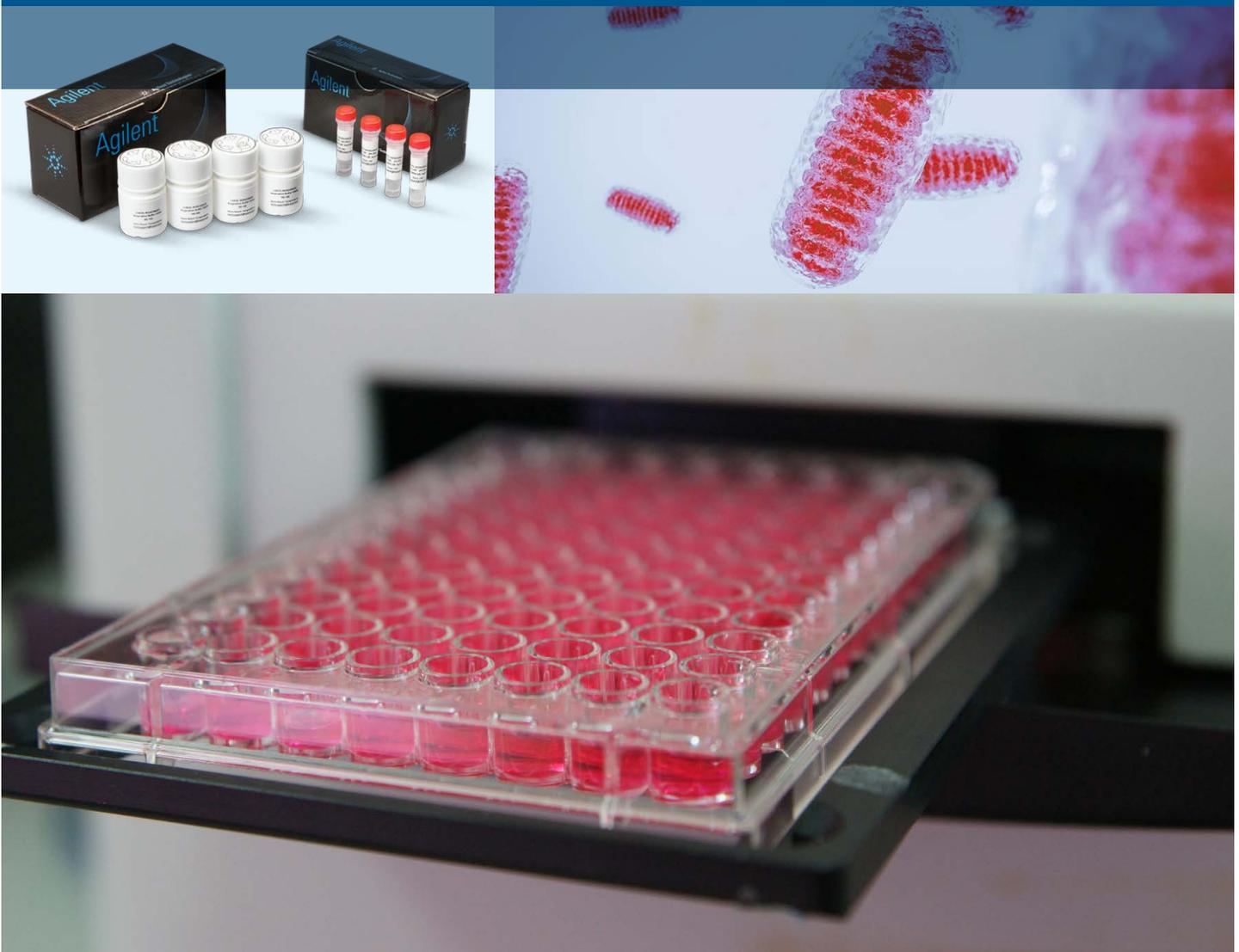


플레이트 리더기에서 세포 대사를 측정하는 애질런트 솔루션



플레이트 리더기의 잠재력을 최대한 활용하십시오



애질런트의 MitoXpress Xtra 산소 소모량 실험, pH Xtra 해당작용 실험 및 애질런트의 MitoXpress Intra 세포 내 산소 실험이 어떻게 유용한 정보를 제공하는지 알아보십시오.

- Live cell 내의 미토콘드리아 활성 및 해당작용 측정
- 간접적인 end-point 세포 기반 실험을 넘어, 미토콘드리아 기능, 해당작용 활성 및 세포 산화의 mix-and-measure 방식의 직접적인 평가
- 기타 관련 실험의 다중 처리
- 부착세포 외에, 부유세포, 미생물 및 특정 3D 배양 시료 측정 가능
- 표준 microplate 상에서 간단한 mix-and-measure 방식의 직접적인 대사 실험으로 처리량을 향상
- 높은 처리량으로 분리된 mitochondria를 손쉽게 측정
- 산소 가용성과 변화된 세포 대사 사이의 관계 연구

MitoXpress Xtra 산소 소모량 실험

세포 산소 소모량 측정



산소 소모량 측정은 세포 대사, 더 구체적으로는 미토콘드리아 기능의 주요 기능 평가 지표입니다. 이와 같은 측정법을 활용하여 live cell 내의 대사를 연구하는 것은 세포 기능 및 질병 진행 과정에서 변화된 대사의 역할에 대한 중요한 역학적 정보를 제공합니다.

MitoXpress Xtra 산소 소모량 실험은 대사 연구에서의 유용한 방법입니다. 이는 형광 플레이트 리더기를 사용해 표준 microplate에서 호기성 대사에 대한 간단한 kinetic 측정을 수행할 수 있도록 해줍니다. 호흡 작용이 진행되면서 시료 내 산소 농도는 감소되며, 이는 MitoXpress Xtra 산소 소모량 측정 신호의 증가로 나타납니다.

그림 1은 MitoXpress Xtra 실험을 사용하여 측정된 인간 iPSC-유래 심근세포(Cor.4U, NCardia)의 산소 소모량을 보여주고 있습니다. Uncoupler FCCP로 처리한 세포에서, 신호 변화율은 호흡 작용의 증가로 인해 증가하였습니다. 반대로 미토콘드리아 호흡 억제제인 Antimycin A로 처리한 경우, 변화율은 산소 소모량의 감소함에 따라 감소되었습니다. 이러한 측정은 여러 가지 조건에서도 수행 가능하며, 다각적인 실험 디자인에 도움이 될 수 있습니다.

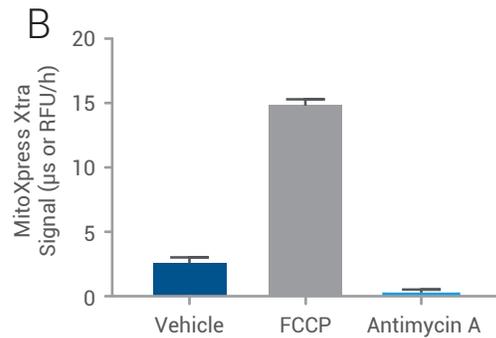
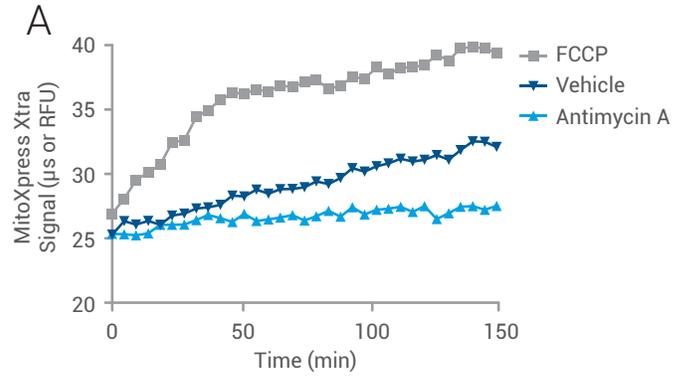


그림 1. (A) MitoXpress Xtra를 사용하여 측정된 Cor.4U(NCardia) 산소 소모량. 세포가 호흡할 때 용해된 산소를 소모하며 이는 MitoXpress Xtra 신호의 증가로 나타납니다. Antimycin A(mitochondrial 호흡 억제제)로 산소 소모를 억제하게 되고 이는 센서 신호의 변화율을 감소 시킵니다. FCCP(uncoupler)로 처리 시, 산소 소모량이 증가되며 따라서 센서 신호 변화율도 증가 됩니다. (B) 이러한 대사 효과를 MitoXpress Xtra 신호 변화율의 실험을 통해 평가할 수 있으며, 그 중 낮은 변화율은 호기성 대사 활동의 감소를 의미합니다.

독성학에서의 MitoXpress Xtra 솔루션

약물로 유발된 독성 스크리닝

약물로 유발된 미토콘드리아 기능 장애는 다양한 약물 분류와 연관이 있으며, 현저하게 간, 심장, 신장, 근육 및 중추신경계에 독성을 유발할 수 있습니다.

Microplate 포맷과 실험 성능을 통해, MitoXpress Xtra 실험은 약물로 유발된 미토콘드리아 역할의 초기 스크리닝 및 does-response 곡선을 볼 수 있는 편리한 솔루션입니다(그림 2) 이 연구는 primary 간세포, hiPSC 유래 심근세포 및 간세포 등의 여러 가지 *invitro* 모델로 수행할 수 있습니다

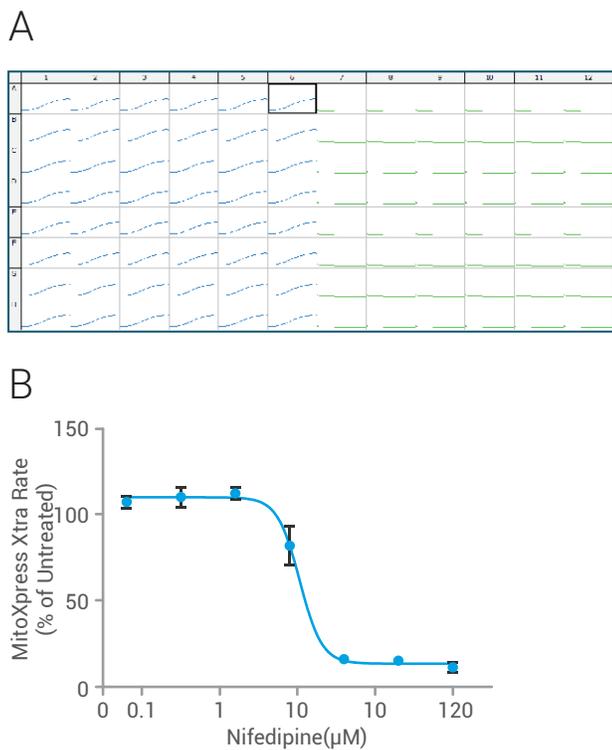


그림 2. (A) 애질런트의 MitoXpress Xtra 실험을 사용해 hiPS-HEP 세포 (Clontech) 내에서 측정된 산소 소모량, Z' factor ~0.7. (B) Nifedipine (칼슘 채널 차단제)이 Cor.4U 심근세포의 미토콘드리아 호흡에 대한 does-response 곡선. 측정값은 vehicle 대조군에 대해 보정(normalized)된 기율기로부터 얻음

분리된 미토콘드리아 호흡 측정

MitoXpress Xtra를 이용해 분리된 미토콘드리아 호흡 측정을 이전보다 더 쉽게 수행할 수 있습니다. 이 실험은 기존의 형광 플레이트 리더기에서 전자전달계(ETC) 활동에 대한 microplate 기반의 직접적이고 편리한 다중 처리 및 평가를 가능하게 합니다(그림 3A). 이는 편리한 화합물 스크리닝과 does-response 실험을 지원합니다(그림 3B). 또한 특정 기질과 억제제의 조합을 사용함으로써, 개별 전자전달계(ETC) complexes 및 관련 미토콘드리아 단백질에 대해 보다 상세한 역학적 평가를 수행할 수 있습니다. 기존 polarographic 접근법 대비, MitoXpress Xtra 실험은 상대적으로 적은 시료량이 필요하기 때문에, 분리당 더 많은 반복 실험을 할 수 있습니다. 보다 낮은 시료량을 요구하기 때문에, 단일 미토콘드리아로부터 얻을 수 있는 데이터의 양이 증가되며, 특히 384-well plate 사용 시 더욱 유용합니다.

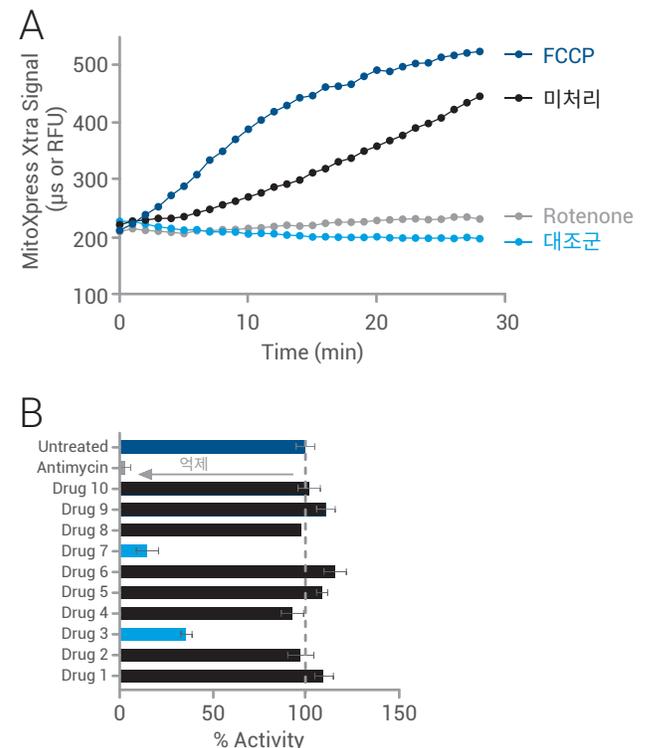


그림 3. 분리된 mitochondria(rat liver) 호흡 작용 분석은 애질런트의 MitoXpress Xtra 실험을 사용해 (A) 일반적인 미토콘드리아 조절제 처리 후의 억제 및 uncoupling 나타남. (B) 약물에 의해 유발된 미토콘드리아 기능 장애를 확인하기 위해 rat liver미토콘드리아를 이용하여 unknown 약물 패널의 스크리닝을 수행(약물 3과 7).

Multiplexing을 위한 MitoXpress Xtra 솔루션

Multiparametric 및 multiplexed된 미토콘드리아 기능 평가

MitoXpress Xtra 또는 pH Xtra 실험을 미토콘드리아 막 전위 (MMP), 활성산소(ROS) 또는 세포 ATP 함량 등과 같은 기타 관련 플레이트 리더기를 통한 파라미터와 결합하면 세포 반응에 대한 보다 자세한 정보를 얻을 수 있습니다. 이는 연구자들로 하여금 처리 또는 조건 변화가 세포 기능에 미치는 영향에 대해 좀더 쉽게 특성 규명할 수 있도록 해줍니다. 이런 방법은 또한 별도의 병행 실험 또는 기술 플랫폼 필요 없이, 관찰된 대사 변화를 쉽게 문서화 할 수 있도록 도와줍니다.

한 사례로 세포 활성의 다중 실험(Calcein AM)과 미토콘드리아 호흡(MitoXpress Xtra)을 활용하여 약물 치료가 세포 기능에 끼친 off-target 효과를 볼 수 있습니다.(그림 4).

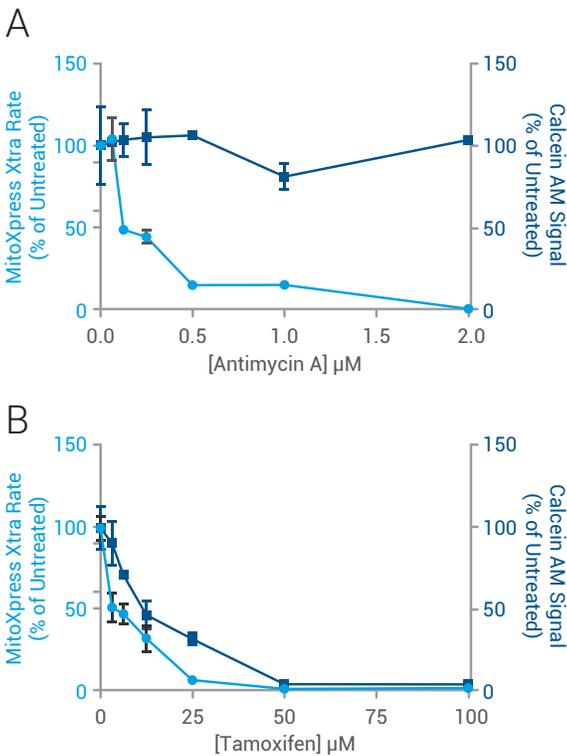


그림 4. (A) Antimycin A와 (B) Tamoxifen을 24시간 동안 HepG2 세포에 처리 후 애질런트의 MitoXpress Xtra 시그널과 Calcein AM 을 이용하여 측정. 두 약물은 모두 미토콘드리아 호흡을 감소시킵니다.(밝은 파란색). Antimycin A 처리를 한 세포의 생존율은 크게 변하지 않는 반면, Tamoxifen은 생존율에 현저한 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. (짙은 파란색). 이는 호흡에 있어서 Antimycin A의 영향은 직접적인 미토콘드리아 메커니즘이 원인임을 알 수 있다.

MMP, ROS 생성과 같은 미토콘드리아 기능 지표는 산소 소모량과 함께 실험할 수 있습니다. 이러한 파라미터들은 세포 생리학에서 미토콘드리아의 역할을 연구할 때 특별히 관심 있는 부분들입니다.

그림 5는 대사 조절제 FCCP와 Antimycin A로 처리된 HepG2 세포에서의 MitoXpress Xtra와 MMP의 다중 측정(JC-1 사용) 데이터입니다. 두 화합물은 모두 막 전위를 낮출 수 있으나, 산소 소모량에도 확실한 영향을 끼치는 것으로 보아, 관련된 여러 가지 파라미터를 측정함으로써 추가적인 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

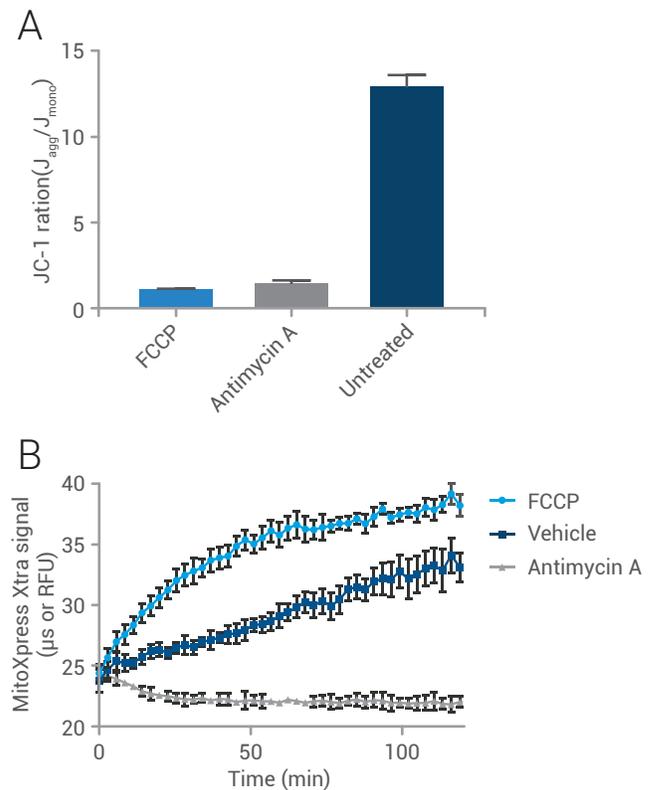


그림 5. 같은 well 내에서 애질런트의 MitoXpress Xtra 시그널과 JC-1 측정. HepG2 세포에 Antimycin A 또는 FCCP 처리. 두 화합물 모두 MMP를 낮춤(A). FCCP는 산소 소모량을 증가시키는 반면, Antimycin A는 호흡을 억제함(B).

미생물 대사 측정을 위한 MitoXpress Xtra 솔루션

미생물 증식, 대사 및 항생제에 대한 반응 측정

MitoXpress Xtra 실험은 여러번의 시료 희석 또는 긴 시간에 걸친 agar-based 실험 없이, 원핵세포 성장 측정 또는 항균 화합물 스크리닝을 할 수 있는 간단한 고감도 플레이트 리더기 기반의 실험법입니다. 이는 또한 미생물 대사 연구를 위한 가치있는 의미를 제공합니다.

플레이트 리더기 포맷은 IC₅₀ 또는 MIC 데이터의 편리한 생성 및 스크리닝에 필요한 처리량과 분해능을 제공합니다. 그림 6은 이 실험법이 어떻게 미생물 증식 측정, dose-response 데이터 생성 및 효모에서의 2개 화합물 처리의 특정 대사 효과 평가 등에 적용되는지를 보여줍니다.

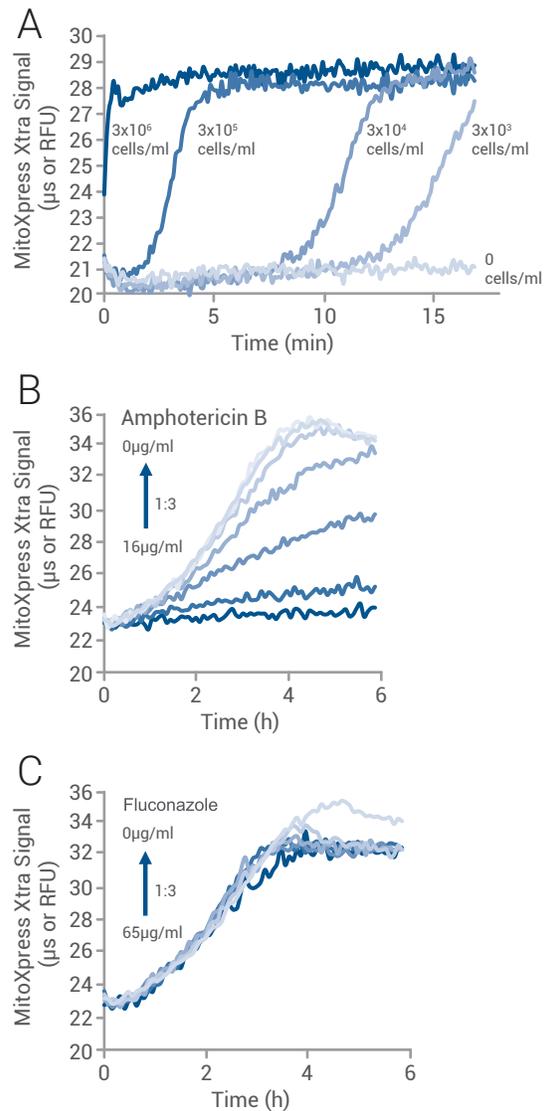


그림 6. *C. albicans* 세포 seeding 농도를 줄이는 상태에서 측정된 산소 소모 프로파일. (A) Amphotericin B(B)와 Fluconazole(C)의 농도를 올려 처리된 *C. albicans*. (C) Amphotericin B는 용량에 따른 산소 소모량 감소를 야기시키는 반면, Fluconazole에서는 산소 소모량이 감소되지 않음. 이와 같은 결과는 약물 작용 기전과 연관되어 있음.

pH Xtra 해당작용 실험

해당 활성 측정



세포 외 산성화 측정은 해당 활성 연구에 많은 정보를 제공할 수 있는 방법이며, pH Xtra 해당작용 실험을 이용해 시분해형광 (TRF) 플레이트 리더기에서 간편하게 수행할 수 있습니다. 세포 외 산성화는 대부분 Pyruvate가 lactate로 전환되는 과정에서 발생되며, 이는 실험 버퍼의 pH 감소를 야기시킵니다. pH Xtra 센서는 센서 신호 증가에 따라 고감도로 pH의 감소를 측정할 수 있습니다.

이러한 pH 측정은 저 산소환경에 암 및 세포가 적응하는 것을 포함한 다양한 종류의 생리학 / 병리학적 과정에서, 변경된 해당작용의 주요 역할에 대해 중요한 정보를 제공합니다.

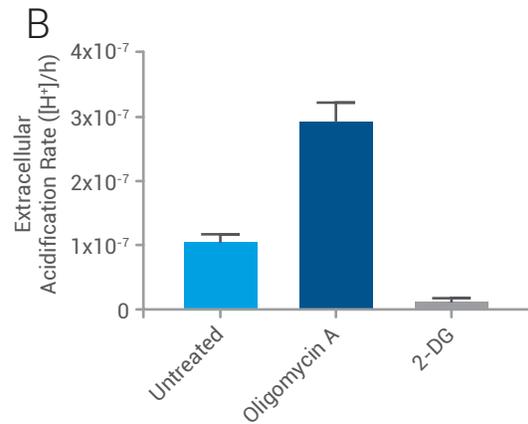
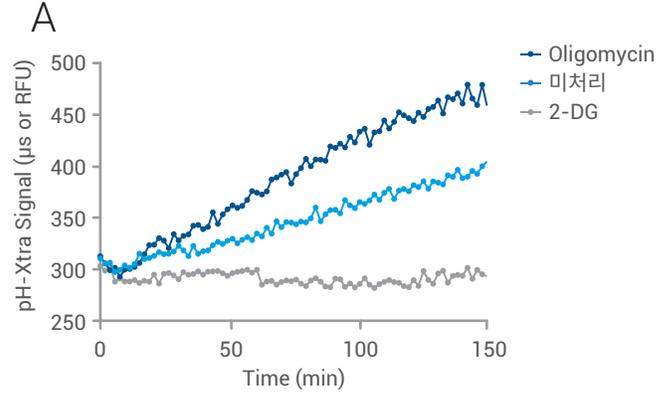


그림 7. (A) 애질런트의 pH Xtra Glycolysis assay를 이용한 A549 해당작용 측정. Hexokinase 억제제 2-Deoxyglucose(2-DG)로 세포 외 산성화 억제, 센서 신호 변화의 감소로 관찰됨. Mitochondrial ATP 생성 억제제 Oligomycin A로 처리할 때, 해당 ATP 생성을 향상시킴으로써 세포 에너지 항상성 유지. (B) 세포 외 산성화의 변화는 시간에 따른 pH 또는 [H⁺] 이온 변화로 손쉽게 평가 가능.

MitoXpress Xtra와 pH Xtra 솔루션

3D 배양에서의 세포 대사 측정

세포 대사에 대한 플레이트 리더기 기반의 측정은 부유 배양물질 및 특정 3D 배양 시스템에서도 수행할 수도 있습니다 (예를 들어 RAFT, Mimetix, Alvetex). 3D에서 세포를 배양하는 것은 복잡한 세포 내의 상호작용을 촉진함으로써, *체외(in vitro)*와 *체내(in vivo)* 간의 생물학적 오차를 줄일 수 있습니다. 그림 8은 MitoXpress Xtra와 pH Xtra 실험이 3D 매트릭스(RAFT, Lonza)에서 3D 구조를 파괴하지 않고 세포 대사를 측정할 수 있는 방법을 보여줍니다.

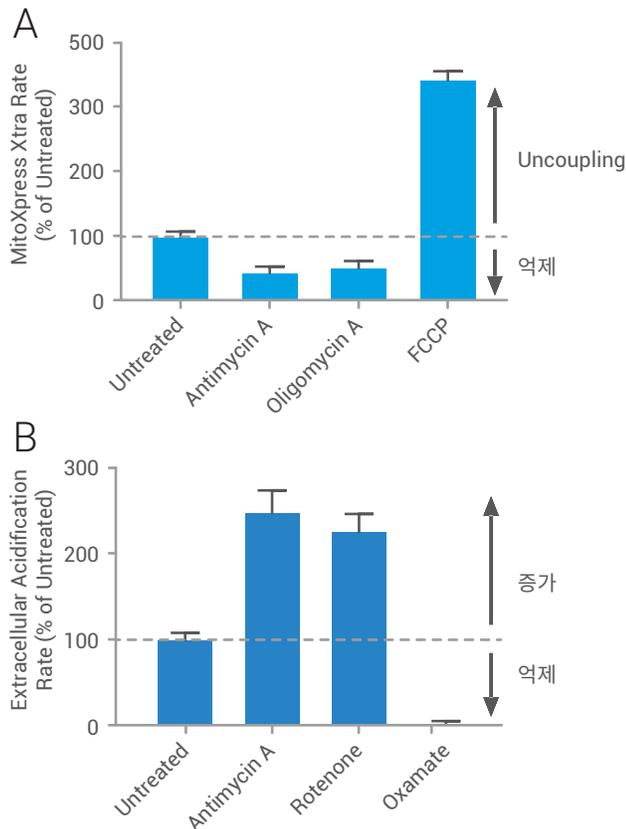


그림 8. (A) 애질런트의 MitoXpress Xtra 실험을 이용하여 A549 3D RAFT 배양상태에서의 산소 소모량에 대한 약물 처리의 상대적 효과 측정. (B) 애질런트의 pH Xtra Glycolysis Assay를 이용하여 HepG2 RAFT 배양상태에서의 세포 외 산성화에 대한 약물 처리의 상대적 효과 측정.

해당작용 및 산소 소모량을 같이 측정

MitoXpress Xtra와 pH Xtra를 함께 사용하면, 후속 대사 연구의 베이스라인으로서 세포대사 균형을 평가할 수 있다. 그림 9는 이러한 병행 실험이 다양한 종류의 세포 산소 소모량과 해당작용 사이의 균형 유지 연구에 어떻게 사용되는지 보여줍니다. 이 그림은 또한 다양한 기질의 가용성이 이러한 대사 균형을 어떻게 조절하는지 보여줍니다.

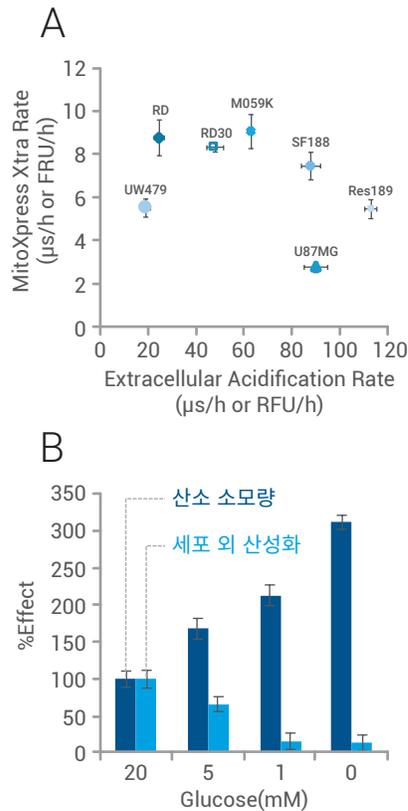


그림 9. (A) 애질런트의 MitoXpress Xtra와 애질런트의 pH Xtra 실험으로 암 세포주의 해당작용과 mitochondrial 호흡에 대한 복합 실험. (B) 글루코스 가용성이 U87MG 세포 대사에 미치는 영향. 글루코스 가용성의 증가는 호흡 감소와 해당작용 증가를 야기(데이터 제공: Dr. Karl Morten, University of Oxford, UK).

MitoXpress Intra 세포 내 산소 실험

세포 내 산화 및 저산소(hypoxia)



세포 수준에서의 산소 가용성은 세포 생리학, 신호 전달, 대사 등에 뚜렷한 영향을 끼칩니다. 결과적으로 특히 암 대사, 의약품 개발, 신경원 및 심혈관 연구 등 *체외(in vitro)* 연구에서는 보다 낮은 생리적 산소 농도를 사용합니다. 그러나 이러한 *체외(in vitro)* 모델에서의 핵심 요소는 다이내믹한 파라미터에서의 변동이 데이터 해석을 어렵게 하기 때문에 세포의 산화를 모니터링 하는 것입니다. 세포 모델이 겪는 산화 조건의 진행 시간과 정도를 파악하는 것은 그래서 매우 중요합니다.

MitoXpress Intra 실험은 live cell의 세포 내 O₂ 농도 측정을 통해 솔루션을 제공합니다. 시약은 세포에 의해 흡수되고 dual-read time-resolved fluorescence (TRF) 기능을 가진 형광 플레이트 리더기로 모니터링 할 수 있습니다. 센서는 대기 조건 또는 세포 호흡 변화로 발생한 세포 내 산소 농도의 변화에 실시간으로 반응합니다.

이 실험은 유용한 모니터링 도구로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 또한 연구자들로 하여금 가용한 산소 농도에 대한 대사 반응 연구를 할 수 있도록 돕습니다. 이러한 파라미터는 ischemia (허혈), 암세포 대사 및 저 산소(hypoxia) 같은 연구에서 매우 중요합니다. 그림 10은 MitoXpress Intra 실험이 세포 산소 농도의 실험치와 적용치 간에 어떠한 뚜렷한 차이가 있는지를 보여주고 있습니다. 이러한 차이는 세포 수, 증식, 유형 및 대사 균형에 따라 달라지기 때문에, 따라서 저산소 세포의 정도는 주변 산소 농도로부터 추정할 수 없습니다.

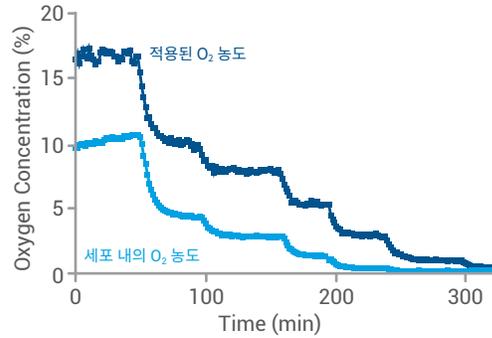


그림 10. 감소되는 대기 O₂ 조건에 대한 반응으로, 3D 배양 조건(RAFT, Lonza)에서 배양된 HepG2 세포의 O₂ 농도 모니터링. 일반 대기 O₂ 조건에서, 세포의 평균 산화 수준은 ~10%인 반면, 주변 O₂ 농도가 5%일 때의 산화 수준은 약 0% O₂로 나타남.

산화 작용의 감소는 생리학적으로 큰 영향을 끼칠 수 있기 때문에, 이를 측정하지 않을 경우 연구 대상 세포 모델이 경험하는 산화 수준의 정보 부족으로 인해 데이터를 잘못 해석할 수 있습니다. 그림 11에서 세포 산화 수준 ~1.5% O₂에서 40%의 HIF 안정화가 관찰되는 사례입니다. 그러나 산화 측정을 하지 않았을 경우, 이 안정화 정도는 산화 수준의 ~5% O₂로 추정될 수도 있습니다.

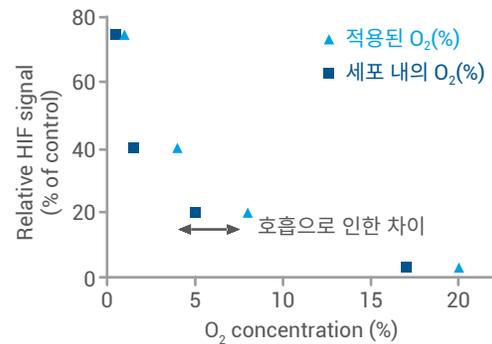


그림 11. 감소되는 산소 농도 조건에서 모니터링한 HT-1080 세포의 발광 HIF-reporter를 이용하여 측정된 HIF 안정화. HIF 안정화는 적용된 산소 농도(밝은 파란색)와 애질런트의 MitoXpress Intra 실험으로 측정된 실제 세포가 경험하는 산소 농도(짙은 파란색)와 연관되어 있음. 이 데이터들은 세포의 산화를 측정하지 않을 경우 산소 가용성과 HIF 안정화 사이의 상관관계에 대해 잘못된 결론을 내릴 수 있음을 보여줌. (데이터 제공: Dr. Karl Morten, University of Oxford, UK)

MitoXpress Intra 솔루션

저산소(Hypoxic) 조건에서의 암 대사 연구

MitoXpress Intra를 이용해 실시간으로 세포 산화를 모니터링하면 세포 모델이 실제로 경험하는 산소 결핍(저산소)의 정도를 정확하게 알 수 있습니다. MitoXpress Xtra 실험처럼, MitoXpress Intra는 생존율 측정, MMP 및 ROS 측정 등을 포함한 기타 플레이트 리더기 기반의 실험과 결합할 수 있습니다. 이는 특히 저 산소(hypoxic) 종양 환경, 대사 유연성 및 암 표현형 사이의 상관 관계가 매우 중요한 암 대사 연구에서 아주 중요한 의미가 있습니다.

그림 12는 MitoXpress Intra와 pH Xtra Glycolysis Assay를 이용한 세포 산화와 해당작용 활동의 다중 측정 사례입니다. 저 산소(hypoxic) 조건과 대기 산소 조건 모두에서 측정을 하였으며, 데이터는 산화가 해당작용 활동에 미치는 영향을 분명히 보여주고 있습니다.

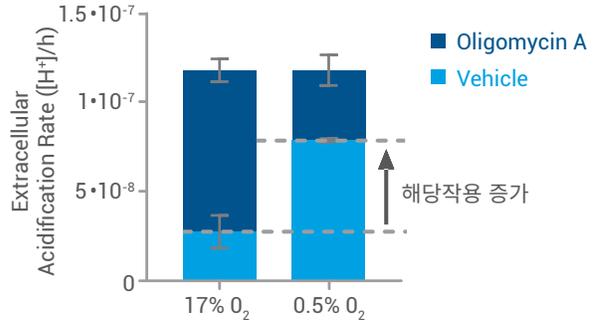
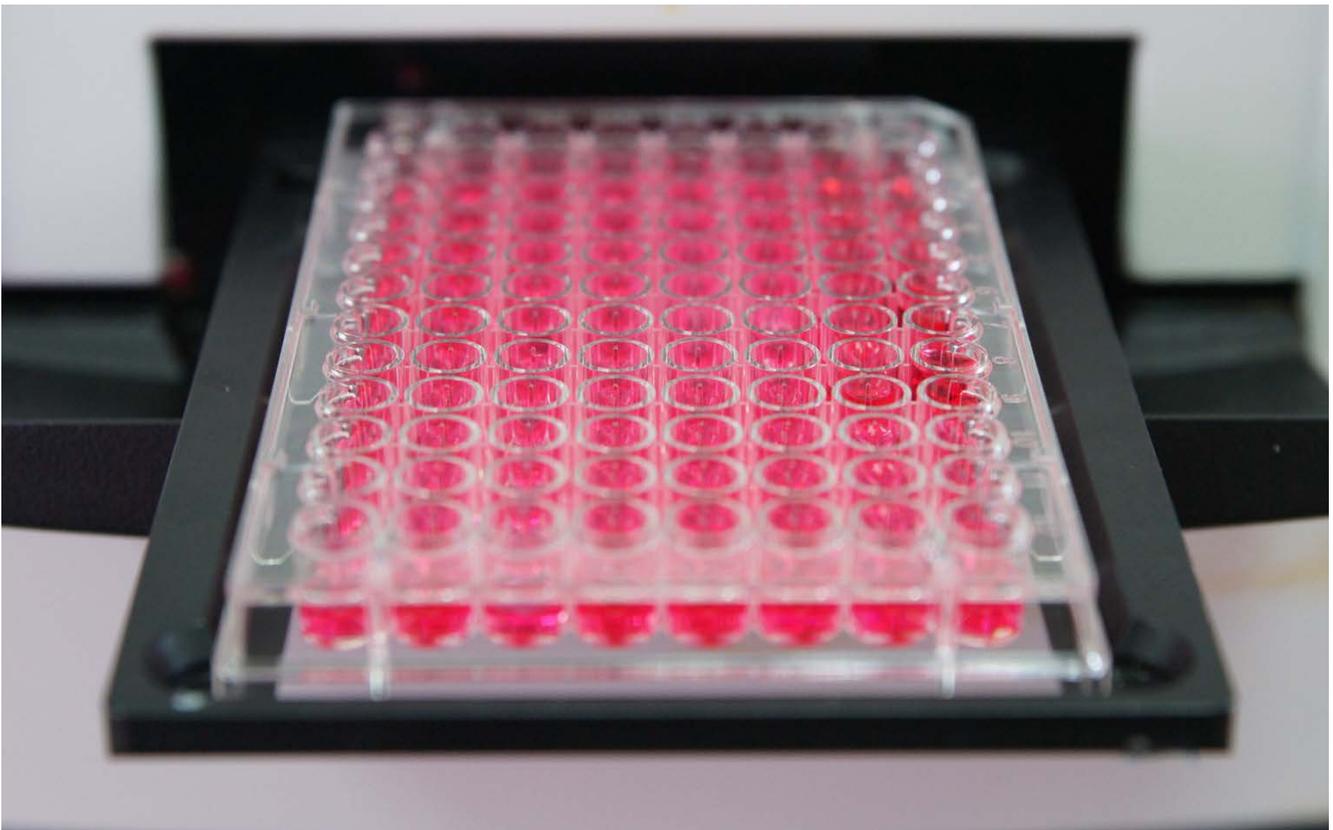


그림 12. 플레이트 리더기의 대기 조절 장치로 만들어진 저산소 조건 하에서 세포 내 산소 농도 측정을 위해 애질런트의 PH Xtra Glycolysis 실험과 애질런트의 MitoXpress Intra 실험을 결합을 통해 측정된 A549 세포의 세포 외 산성화 실험. Vehicle 처리 세포의 기초 세포외 산성화율은 저 산소 조건(밝은 파란색)에서 약 3배 향상된 반면, Oligomycin(짙은 파란색, mitochondrial ATP 생성 억제제) 처리 후에 측정된 해당작용 능력은 일정하게 유지되었습니다.

애질런트의 장점

대사는 모든 세포 반응을 지원하고 있기 때문에, 세포 생물학 분야에서 핵심 기능 측정이라 할 수 있습니다. 다양한 형광 플레이트 리더기와 호환되는 대사 센서를 제공하는 애질런트는 *체외(in vitro)* 상에서의 세포 대사 연구를 위한 통합적인 솔루션을 제공합니다. 본 자료에서 설명한 application은 이러한 실험들이 세포 대사 및 기능 실험에서 어떻게 사용되는지를 보여줍니다. 추가 자료, 보다 자세한 프로토콜 및 애질런트의 수용성 대사 센서가 연구에 어떻게 도움이 되는지에 대해 알아보시려면 www.agilent.com을 방문하시거나 cellanalysis.support@agilent.com으로 직접 연락해주시기 바랍니다.



애질런트 세포 실험 Portfolio

애질런트 실시간 live cell 실험은 여러 연구자들로 하여금 실험의 분야의 한계를 넘어 다양한 분야로 연구가 확대되도록 도움을 주었습니다.

애질런트 솔루션 포트폴리오에 대한 자세한 정보를 알아보시려면 다음 웹사이트를 참조하십시오.

www.agilent.com/chem/discoverxf

추가 정보

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables

논문 데이터베이스

www.agilent.com/publications-database/

세포 참조 데이터베이스

www.agilent.com/cell-reference-database/

웨비나

www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series

글로벌 기술 지원 팀

cellanalysis.support@agilent.com

미국 및 캐나다

1-800-227-9770; 옵션 3을 선택한 다음 8를 선택하십시오

유럽

영국: 0500 096 7632

독일: 0800 180 66 78

기타 EU: +45 3236 9878

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2019
2019년 4월 16일, 한국에서 발행
5994-0683KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr