

Kits XF de test du stress oxydant du substrat : Test standard

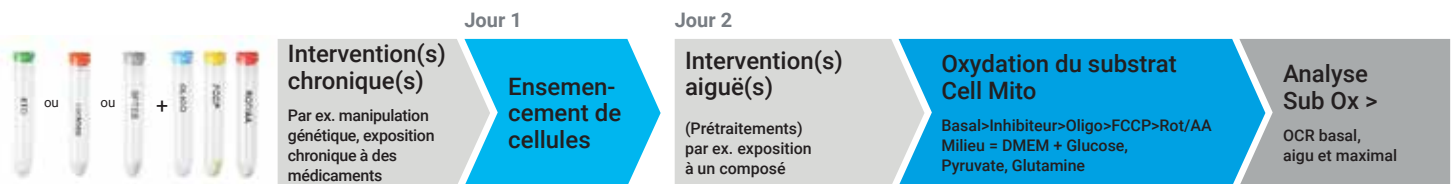


Figure 1. Conception de test standard du kit de test du stress oxydant des acides gras à longue chaîne XF (Réf. 103672-100), kit de test du stress oxydant du glucose/pyruvate XF (Réf. 103673-100), et kit de test du stress oxydant de la glutamine XF (Réf. 103674-100)

Un jour avant le test

1. Assurez-vous que l'analyseur XF est allumé et qu'il a été équilibré à la température de 37 °C (un minimum de 5 heures).
2. Hydratez une cartouche de capteur dans de l'eau stérile ou distillée à 37 °C dans un incubateur sans CO₂ pendant une nuit.
3. Pour les cellules adhérentes, ensemencez les cellules à la densité requise dans du milieu de culture cellulaire.
4. Utilisez la matrice du test standard de stress oxydant du substrat XF pour concevoir l'expérience avec Wave et modifiez la matrice afin de l'adapter à votre méthodologie.

Le jour du test

1. Terminez l'hydratation de la cartouche du capteur : remplacez l'eau par la solution étalon XF (200 µL/puits pour les plaques XF96 ou 500 µL/puits pour les plaques XF24) et laissez incuber à 37 °C sans CO₂ pendant 1 heure.
2. Préparez 100 mL de milieu de test : Ajoutez les substrats XF d'Agilent aux milieux XF DMEM ou XF RPMI (Tableau 1).
3. Aspirez le milieu de la plaque de culture cellulaire et remplacez-le par le milieu du test : 180 µL pour les plaques de 96 puits, 500 µL pour les plaques de 24 puits.
4. Placez la plaque de culture cellulaire dans un incubateur sans CO₂ à 37 °C pendant 60 min ou dans l'instrument Biotek pour la normaliser.
5. Préparez les solutions mères : remettez les composés séchés en suspension dans le milieu du test et mélangez sur vortex pendant ~ 1 min (Tableau 2, au verso).

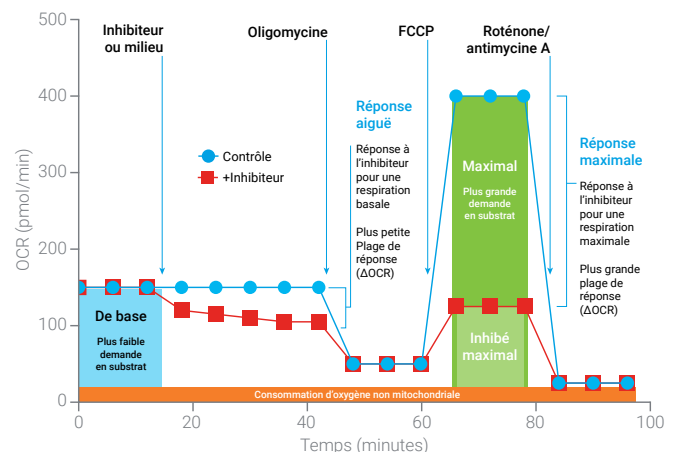


Figure 2. Résultats du test standard

Composante du milieu du test	Volume (mL)	Concentration finale (mM)
Milieu Agilent Seahorse XF DMEM ou RPMI, pH 7,4	97	-
Glucose XF (1 M)	1,0	10
Pyruvate XF (100 mM)	1,0	1,0
Glutamine XF (200 mM)	1,0	2,0

Tableau 1. Milieu du test standard du stress oxydant du substrat.

Port	Composé	Solution mère	Solutions de travail 10X pour les ports d'injection		Volume ajouté au port (µL)	
		Volume de milieu du test (µL)	Volume de solution mère (µL)	Volume de milieu du test (µL)	XFe96/XFe24	Concentration finale dans le puits (µM)
A	Étomoxir ou	700	500	1500	20/56	4,0
	UK5099 ou	700	500	1500	20/56	2,0
	BPTES	700	500	1500	20/56	3,0
B	Oligomycine	420	300	2700	22/62	1,5
C	FCCP (utiliser la concentration optimale établie avant l'analyse)	720	75	2925	25/69	0,25
			150	2850	25/69	0,5
			300	2700	25/69	1,0
			600	2400	25/69	2
D	Roténone + antimycine A	540	300	2700	27/75	0,5

Tableau 2. Tests standard du stress oxydant du substrat : solutions mères et solutions de travail.

- À partir des solutions mères, préparez des solutions de travail 10X en mélangeant les solutions mères avec la quantité appropriée de milieu du test (Tableau 2, au verso).
- Pipetez les solutions de travail 10X dans chacun des quatre ports d'injection (Tableau 2). *Remarque : utilisez le milieu du test dans le Port A pour les puits témoins (c.-à-d. l'inhibiteur).*
- Ouvrez Wave et la matrice conçue pour le test. Quand vous êtes prêt, cliquez sur **Démarrer une analyse**.
- Quand la machine vous le demande, placez la cartouche du capteur chargée dans l'analyseur et cliquez sur **Je suis prêt**.
- Après l'étalonnage, Wave affichera Chargez la plaque de culture. Cliquez sur **Ouvrir le plateau**, puis remplacez la plaque utilitaire par la plaque de culture cellulaire.
- Assurez-vous que le couvercle a bien été enlevé de la plaque de culture cellulaire, puis cliquez sur **Chargez la plaque de culture** pour démarrer l'analyse.
- Facultatif : effectuez une normalisation cellulaire post-analyse avec l'instrument Biotek.

Informations pour commander

Description	Référence
Kit XF de test du stress oxydant des acides gras à longue chaîne	103672-100
Kit XF de test du stress oxydant du glucose/pyruvate	103673-100
Kit XF de test du stress oxydant de la glutamine	103674-100
Milieu DMEM pour Agilent Seahorse XF, pH 7,4	103575-100
Milieu Agilent Seahorse XF RPMI, pH 7,4	103576-100
Solution de glucose Agilent Seahorse XF, 1,0 M	103577-100
Solution de pyruvate Agilent Seahorse XF, 100 mM	103578-100
Solution de glutamine Agilent Seahorse XF, 200 mM	103579-100

Informations complémentaires :

Manuel d'utilisation des kits de test de stress oxydant du substrat XF :

www.agilent.com/chem/subox-usermanual

Centre de formation d'Agilent pour XF :

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay

Assistance technique :

cellanalysis.support@agilent.com

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.