

# Kit XF de test du stress oxydant du palmitate : Test approfondi

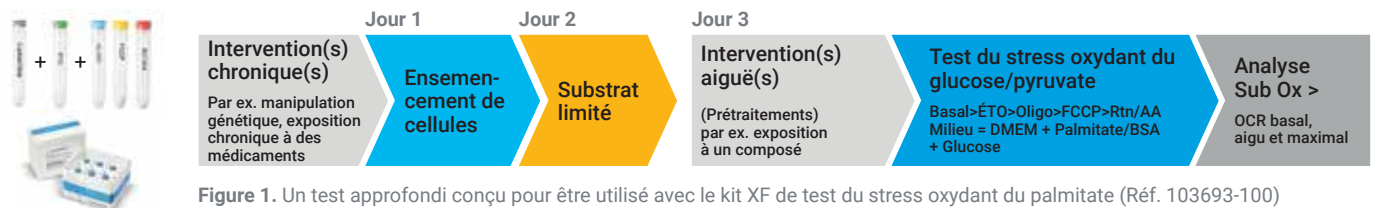


Figure 1. Un test approfondi conçu pour être utilisé avec le kit XF de test du stress oxydant du palmitate (Réf. 103693-100)

## Deux jours avant le test (Jour 1)

1. Pour les cellules adhérentes,ensemencez les cellules à la densité requise dans du milieu de culture cellulaire.
2. Utilisez la matrice du test approfondi de stress oxydant du substrat XF pour concevoir l'expérience en Wave et modifiez la matrice afin de l'adapter à votre expérience.

## Un jour avant le test (Jour 2)

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 CO<sub>2</sub> pendant une nuit.
3. Préparez un volume approprié de milieu de culture avec substrat limité (~15 mL, Tableau 1).
4. Aspirez le milieu de culture de la plaque de culture cellulaire et remplacez par le milieu de culture avec substrat limité (100 µL pour les plaques de 96 puits, 250 µL pour les plaques de 24 puits) ; laissez incuber une nuit.

## Le jour du test (Jour 3)

1. Terminez l'hydratation de la cartouche du capteur : remplacez l'eau par le calibrant XF (200 µL/puits pour les plaques XF96 ou 500 µL/puits pour les plaques XF24) et laissez incuber à 37 °C sans CO<sub>2</sub> pendant 1 heure.
2. Préparez 75 mL de milieu de test : Ajoutez les substrats XF d'Agilent aux milieux XF DMEM ou XF RPMI (Tableau 2).
3. Aspirez le milieu de la plaque de culture cellulaire et remplacez-le par le milieu du test avec substrat limité : 180 µL pour les plaques de 96 puits, 500 µL pour les plaques de 24 puits (remarque : le palmitate et la BSA seront ajoutés juste avant le test, à l'étape 10).
4. Placez la plaque de culture cellulaire dans un incubateur sans CO<sub>2</sub> à 37 °C pendant 60 min ou dans l'instrument Biotek pour la normaliser.

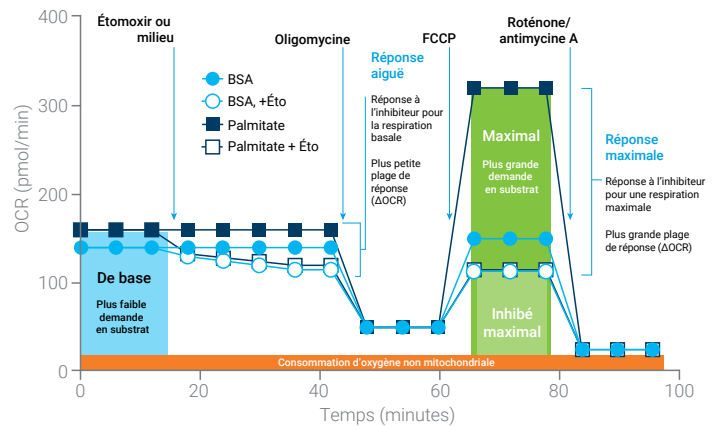


Figure 2. Résultats du test approfondi

Milieu de croissance de base	Supplément de milieux de croissance	Concentration initiale conseillée pour les milieux de croissance avec substrat limité
DMEM ou RPMI sans glucose, pyruvate, glutamine, ou GlutaMAX	Glucose	0,5 mM
	Glutamine ou GlutaMAX	1,0 mM
	Sérum (par ex., SVF)	1,0 %
	L-Carnitine XF	0,5 mM

Tableau 1. Composition initiale conseillée pour les milieux de croissance avec substrat limité.\*

\* Les concentrations optimales de substrat limité et le temps optimal d'incubation dépendent des cellules et doivent être établis de manière empirique pour le type de cellule en question.

- Préparez les solutions mères : remettez les composés lyophilisés en suspension dans le milieu du test et mélangez sur vortex pendant ~ 1 min (Tableau 3).
- À partir des solutions mères, préparez des solutions de travail 10X en mélangeant les solutions mères avec la quantité appropriée de milieux du test (Tableau 3).
- Pipetez les solutions de travail 10X dans chacun des quatre ports d'injection (Tableau 3). *Remarque : Utilisez le milieu du test dans le Port A pour les puits témoins (c.-à-d. l'étomoxir).*
- Ouvrez Wave et la matrice conçue pour le test. Quand vous êtes prêt, cliquez sur **Démarrer une analyse**.
- Une fois l'étalonnage de la cartouche du capteur terminé, aspirez le milieu de la plaque de culture cellulaire et remplacez-le par le milieu du test avec substrat limité : 130 µL pour les plaques de 96 puits, 415 µL pour les plaques de 24 puits
- Ajoutez le palmitate-BSA ou la BSA témoin aux puits appropriés de la plaque de culture cellulaire : 30 µL pour les plaques XFe96, 85 µL pour les plaques XFe24.
- 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.

Composante du milieu du test	Volume	Concentration finale (mM)
Milieu Agilent Seahorse XF DMEM ou RPMI, pH 7,4	75 mL	-
Glucose XF (1 M)	150 µL	2,0
L-Carnitine XF	75 µL	0,5

**Tableau 2.** Milieu de test initial conseillé avec substrat limité. Il est à noter que le Palmitate-BSA et la BSA témoin sont ajoutés juste avant l'analyse, voir l'étape 10.

Port	Composé	Solution mère	Solutions de travail 10X pour les ports d'injection			Volume ajouté au port (µL)	Concentration finale dans le puits (µM)
		Volume de milieu du test (µL)	Volume de solution mère (µL)	Volume de milieu du test (µL)	XFe96/XFe24		
A	Étomoxir	700	500	1500	20/56	4,0	
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 3.** Tests standard du stress oxydant du substrat : solutions mères et solutions de travail.

### Informations pour commander

Description	Référence
Kit de test du stress oxydant du palmitate XF	103693-100
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

### Informations complémentaires :

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

[www.agilent.com/chem/subox-usermanual](http://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](http://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-to-run-an-assay)

Assistance technique :

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

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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.