

Набор тестов на скорость окисления пальмитата в условиях стресса Agilent XF: дополнительный тест

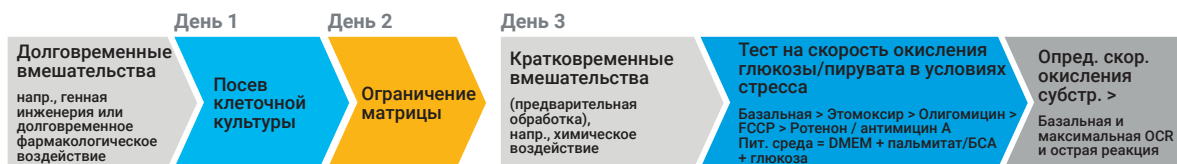


Рисунок 1. Схема дополнительного эксперимента для теста на скорость окисления пальмитата в условиях стресса Agilent XF (кат. № 103693-100).

За два дня до теста (день 1)

1. Для закрепленных культур: высеять клеточную культуру с заданной плотностью в питательную среду для культивации.
2. С помощью шаблона «Дополнительный тест» теста на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF создать в программе Agilent Wave схему теста и внести в нее необходимые изменения для соответствия плану вашего эксперимента.

За один день до теста (день 2)

1. Убедиться в том, что анализатор Agilent XF включен и уравновешен при температуре 37 °C (не менее 5 ч).
2. Выдержать патрон датчика для набухания в инкубаторе в стерильной или дистиллированной воде при 37 °C в атмосфере, не содержащей CO₂, в течение ночи.
3. Приготовить нужное количество питательной среды с ограниченной концентрацией матрицы (около 15 мл, см. табл. 1)
4. Откачать питательную среду с планшета с культурой и заменить ее питательной средой с ограниченной концентрацией матрицы (100 мкл для 96-луночного планшета, 250 мкл для 24-луночного планшета), инкубировать в течение ночи.

День выполнения теста (день 3)

1. Завершить набухание патрона датчика: заменить воду калибровочным стандартом Agilent XF (200 мкл на лунку для планшета Agilent XF96, 500 мкл на лунку для планшета Agilent XF24) и инкубировать при 37 °C в атмосфере, не содержащей CO₂, в течение часа.
2. Приготовить 75 мл питательной среды для проведения теста: добавить в среду Agilent XF DMEM или Agilent XF RPMI матрицы Agilent XF (табл. 2).
3. Откачать питательную среду с планшета с культурой и заменить ее питательной средой с ограниченной концентрацией матрицы: 180 мкл для 96-луночного планшета, 500 мкл для 24-луночного планшета (Примечание. Пальмитат и БСА добавляются непосредственно перед проведением теста в шаге 10).
4. Поместить планшет с культурой в инкубатор при 37 °C в атмосфере, не содержащей CO₂, на 60 мин или в прибор Biotek для нормировки.

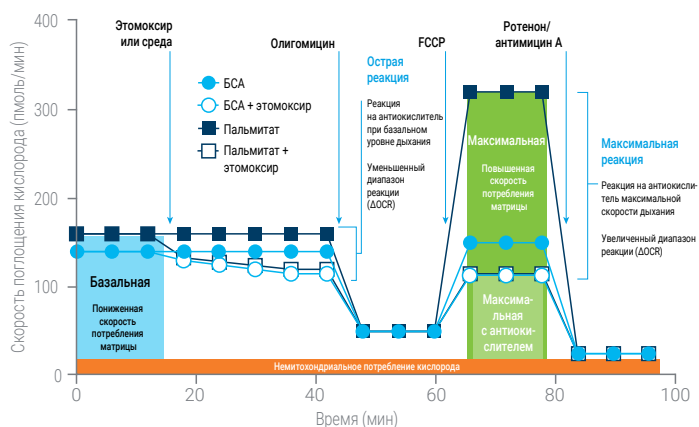


Рисунок 2. Результаты дополнительного теста.

Базовая питательная среда	Добавка к питательной среде	Рекомендуемая начальная концентрация в питательной среде с ограниченной концентрацией матрицы
DMEM или RPMI без глюкозы, пирувата, глутамина или GlutaMAX	Глюкоза	0,5 мкмоль/л
	Глутамин или GlutaMAX	1,0 мкмоль/л
DMEM или RPMI без глюкозы, пирувата, глутамина или GlutaMAX	Сыворотка (например, фетальная бычья)	1,0%
	L-карнитин Agilent XF L-Carnitine	0,5 мкмоль/л

Таблица 1. Рекомендуемый начальный состав питательной среды с ограниченной концентрацией матрицы*.

* Оптимальные концентрации матрицы и продолжительность инкубирования зависят от исследуемой клеточной культуры и устанавливаются для нее опытным путем.

- Приготовить базовый раствор: развести сухие соединения в питательной среде для проведения теста и перемешивать на вихревой мешалке около 1 мин (табл. 3).
- Из базовых растворов приготовить рабочие растворы десятикратной концентрации, разбавив базовые растворы соответствующим количеством питательной среды для проведения теста (табл. 3).
- Перенести рабочие растворы в каждый из четырех портов инжектора (табл. 3). *Примечание. Для контрольного теста (с отсутствием антиокислителя) в порт А заливается питательная среда для проведения теста.*
- Открыть программу Agilent Wave и созданную ранее схему теста. По готовности нажать кнопку **Начать тест**.
- После окончания калибровки патрона датчика откачать питательную среду с планшета с культурой и заменить ее питательной средой с ограниченной концентрацией матрицы: 130 мкл для 96-луночного планшета, 415 мкл для 24-луночного планшета.
- Добавить пальмитат-БСА или БСА (для контрольного теста) в соответствующие лунки планшета с культурой: 30 мкл для Agilent XFe96, 85 мкл для Agilent XFe24.

- По запросу программы поместить заполненный патрон датчика в анализатор и нажать **Я готов**.
- После калибровки программа Agilent Wave выведет приглашение **Загрузите планшет с культурой**. Нажать кнопку **Открыть поддон** и заменить вспомогательный планшет планшетом с культурой.
- Убедиться в том, что с планшета с культурой снята крышка, и нажать **Загрузить планшет с культурой**, чтобы начать тест.
- Дополнительно: выполнить нормировку после проведения теста с помощью прибора Biotek.

Компоненты питательной среды для проведения теста	Объем	Конечная концентрация (ммоль/л)
Питательная среда Agilent Seahorse XF DMEM или RPMI, pH 7,4	75 мл	–
Глюкоза Agilent XF Glucose (1 моль/л)	150 мкл	2,0
L-карнитин Agilent XF L-Carnitine	75 мкл	0,5

Таблица 2. Рекомендуемая начальная питательная среда с ограниченной концентрацией матрицы. Примечание. Пальмитат-БСА и БСА для контроля добавляются непосредственно перед проведением теста, см. шаг 10.

Порт	Соединение	Базовый раствор	Рабочие растворы десятикратной концентрации для заливки в порты инжектора		Объем, заливаемый в порт (мкл)	Конечная концентрация в лунке (ммоль/л)
		Объем питательной среды теста (мкл)	Объем базового раствора (мкл)	Объем питательной среды теста (мкл)	XFe96/XFe24	
A	Этомоксир	700	500	1 500	20/56	4,0
B	Олигомицин	420	300	2 700	22/62	1,5
C	ФССР (использовать определенную перед проведением теста оптимальную концентрацию)	720	75	2 925	25/69	0,25
			150	2 850	25/69	0,5
			300	2 700	25/69	1,0
			600	2 400	25/69	2
D	Ротенон и антимицин А	540	300	2 700	27/75	0,5

Таблица 3. Стандартные тесты на скорость окисления матрицы в условиях стресса: базовые и рабочие растворы.

Сведения о порядке заказа

Описание	Каталожный номер
Набор тестов на скорость окисления пальмитата в условиях стресса Agilent XF	103693-100
Питательная среда Agilent Seahorse XF DMEM, pH 7,4	103575-100
Питательная среда Agilent Seahorse XF RPMI, pH 7,4	103576-100
Раствор глюкозы Agilent Seahorse XF 1 моль/л	103577-100

Дополнительная информация

Руководство пользователя тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF:

www.agilent.com/chem/subox-usermanual

Центр обучения Agilent XF:

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

Техническая поддержка:

cellanalysis.support@agilent.com

Только для научно-исследовательских целей.
Не для использования в диагностических процедурах.

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.