

# XF Palmitate 산화 스트레스 측정 키트: 고급 분석



그림 1. XF Palmitate 산화 스트레스 측정 키트(p/n 103693-100)에 사용하기 위한 진보된 분석 디자인

## 분석 이틀 전(1일차)

- 부착 세포의 경우, 세포 배양 성장 배지에서 미리 정해진 세포 수로 세포를 플레이팅합니다.
- XF 기질 산화 스트레스 측정 - 고급 분석 템플릿을 이용해 Wave에서 실험을 디자인하고 실험 디자인에 맞게 템플릿을 수정합니다.

## 분석 하루 전(2일차)

- XF 분석기의 전원이 켜져 있고 37°C로 온도 안정화(최소 5시간)를 유지해야 합니다.
- 일반(non-CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 37°C의 멸균수 또는 증류수에 센서 카트리지를 overnight 동안 hydration시킵니다.
- 적당한 볼륨의 기질이 제한된 성장 배지(약 15mL, 표 1)를 준비합니다.
- 세포 플레이트에서 성장 배지를 제거하고 기질 제한 성장 배지로 교체하며(96-well plate의 경우 100µL, 24-well plate의 경우 250µL) overnight동안 배양합니다.

## 실험 당일(3일차)

- 센서 카트리지 hydration 완료: 증류수를 XF 캘리브레이션(XF96의 경우 200µL/well 또는 XF24의 경우 500µL/well)으로 교체하고 이산화탄소가 공급되지 않는 37°C에서 (no CO<sub>2</sub>) 1시간 동안 배양합니다.
- 75mL 실험 배지 준비: XF 애질런트 기질로 XF DMEM 또는 XF RPMI를 보충합니다(표 2).
- 세포 플레이트에서 배지를 제거하고 기질 제한 분석 배지로 교체: 96-well plate의 경우 180µL, 24-well plate의 경우 500µL(주의: 실험 직전에 palmitate 및 BSA 첨가, 10단계).
- 세포 플레이트를 일반(non-CO<sub>2</sub>) 37°C 인큐베이터에 60분 동안 배양하거나 보정(normalization)을 위해 Biotek 기기에 넣습니다.

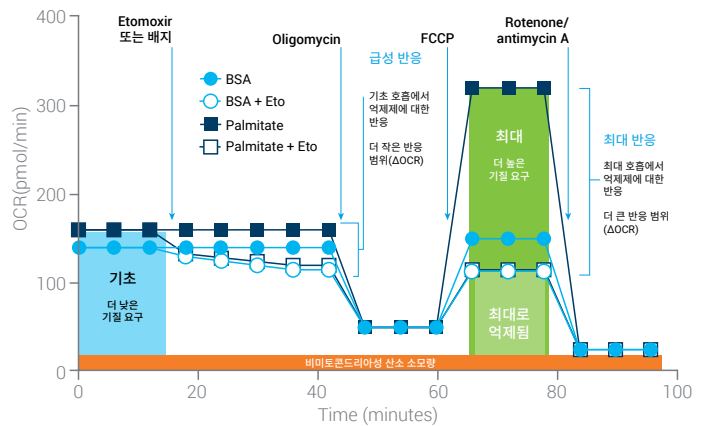


그림 2. 진보된 실험 결과

기초 성장 배지	성장 배지 보충제	기질 제한 성장 배지에서 권장하는 초기 농도
	Glucose	0.5mM
DMEM or RPMI without glucose, pyruvate, glutamine, or GlutaMAX	Glutamine or GlutaMAX	1.0mM
	Serum (e.g., FBS)	1.0%
	XF L-Carnitine	0.5mM

표 1. 권장하는 초기 기질 제한 성장 배지 조성.\*

\* 최적의 제한 기질 농도와 최적의 배양 시간은 세포에 따라 다르며 주요 세포 유형은 실험을 통해 결정해야 합니다.

5. Stock 솔루션 준비: 전용 실험 배지에 파우더 타입의 시약을 resuspend시키고 약 1분 동안 vortex 처리합니다(표 3).
6. Stock 솔루션을 이용하여 적당한 양의 전용 실험 배지와 혼합하여 10X working 솔루션을 준비합니다(표 3).
7. 10X working 솔루션을 4개의 약물 포트 각각에 피펫팅합니다 (표 3). *참고: Port A에 대조군(예시, etomoxir) well용으로 전용 실험 배지를 사용합니다.*
8. Wave 및 디자인된 분석 템플릿을 엽니다. 준비가 되면 **Start Run** (실행 시작)을 클릭합니다.
9. 센서 카트리지가 캘리브레이션이 끝나면 세포 플레이트에서 배지를 제거하고 기질 제한 분석 배지로 교체: 96-well plate의 경우 130µL, 24-well plate의 경우 415µL
10. 해당 세포 플레이트 well에 Palmitate-BSA 또는 BSA 대조군 첨가: XFe96의 경우 30µL, XFe24의 경우 85µL.

11. 메시지가 나타나면 로드된 센서 카트리지를 분석기에 넣고 **I'm Ready**(준비 완료)를 클릭합니다.
12. 검량이 끝나면 Wave에 **Load Cell Plate**(세포 플레이트 로드)가 표시됩니다. **Open Tray**(트레이 열기)를 클릭한 다음 유틸리티 플레이트를 세포 플레이트로 교체합니다.
13. 세포 플레이트에서 리드를 제거했는지 확인한 다음 **Load Cell Plate**(세포 플레이트 로드)를 클릭하여 분석을 시작합니다.
14. 옵션: Biotek 기기를 사용하여 분석 후 세포 정규화 (normalization)를 수행합니다.

실험 배지 성분	볼륨	최종 농도(mM)
Seahorse XF DMEM or RPMI Medium, pH 7.4	75mL	-
XF Glucose(1M)	150µL	2.0
XF L-Carnitine	75µL	0.5

표 2. 권장하는 초기 기질 제한 분석 배지. Palmitate-BSA 및 BSA 대조군은 실험 직전에 첨가됩니다(10단계 참조).

포트	화합물	Stock 솔루션	약물 주입 포트용 10X working 솔루션			포트에 추가되는 볼륨(µL)	
			실험 배지 볼륨(µL)	Stock 솔루션 볼륨(µL)	실험 배지 볼륨(µL)	XFe96/XFe24	최종 well 농도(µM)
A	Etomoxir	700	500	1500	20/56	4.0	
B	Oligomycin	420	300	75	2925	25/69	0.25
				150	2850	25/69	0.5
				300	2700	25/69	1.0
				600	2400	25/69	2
C	FCCP (use optimal concentration determined prior to assay)	720	300	2700	27/75	0.5	
D	Rotenone + antimycin A	540	300	2700	27/75	0.5	

표 3. 표준 기질 산화 스트레스 측정: Stock 및 working 솔루션

## 추가 정보

XF 기질 산화 스트레스 측정 키트 사용자 매뉴얼:

[www.agilent.com/chem/subox-usermanual](http://www.agilent.com/chem/subox-usermanual)

Agilent XF Learning Center:

[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)

기술 지원:

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

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
2020년 1월 28일, 한국에서 인쇄  
5994-1716KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울 특별시 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)

## 주문 정보

설명	제품 번호
XF Palmitate Oxidation Stress Test Kit	103693-100
Seahorse XF DMEM Medium, pH 7.4	103575-100
Seahorse XF RPMI Medium, pH 7.4	103576-100
Seahorse XF 1.0 M Glucose	103577-100