

Agilent Seahorse XF Pro M 세포 배양 마이크로플레이트에 부착 세포 시딩

서론

Agilent Seahorse XF 분석은 Agilent Seahorse XF Pro M 세포 배양용 마이크로플레이트와 Agilent Seahorse XFe96/XF Pro 센서 카트리지를 이용해 이루어집니다. 각 마이크로플레이트는 일반적인 96-well 및 4-moat well 형태로 되어있습니다. 이 절차에서는 Agilent Seahorse XF Pro 분석기를 이용한 Seahorse XF 분석에서 최고의 결과를 얻기 위한 부착 세포 시딩에 대한 권장 사항을 설명합니다.

기본적인 세포 시딩 워크플로

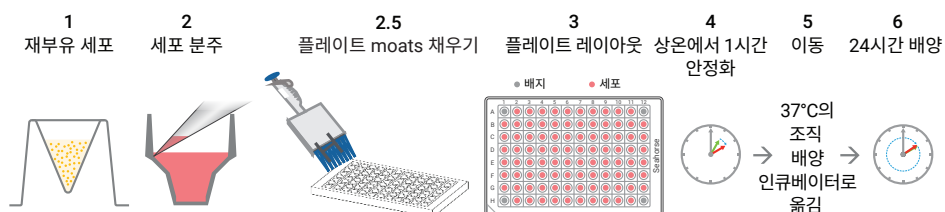


그림 1. Agilent Seahorse XF 조직 배양 마이크로플레이트 세포 시딩 절차 워크플로.

1. 80μL의 growth 배지에 시딩하기 위해 원하는 최종 농도로 세포를 수확하고 재부유시킵니다. 일반적인 세포 시딩 양에 대해서는 아래 차트를 참고해 주세요. 다음 중 하나를 선택합니다. 1) 세포 부유액을 1×10⁶ cell/mL로 희석하고 아래 표에 기재된 농도로 만들기 위해 다시 희석합니다. 또는 2) 세포 부유액을 공식 1에 나온 세포 양으로 만들기 위해 희석합니다. 여기에서 ‘cells’는 세포 수이며, ‘volume’은 mL입니다.

$$\text{공식 1: } \text{cells}^{\text{stock}} \times \text{volume}^{\text{stock}} = \text{cells}^{\text{final}} \times \text{volume}^{\text{final}}$$

2. 그림 1에 나온 것과 같이 well 1개당 세포 부유액 80μL를 시딩합니다(cells/well). 백그라운드 well에는 세포를 시딩하지 않습니다(A1, A12, H1, H12).
3. 세포가 없는 백그라운드 well에만 배지를 첨가합니다.

4. 각 moat well에 1.0mL의 세포 배양에 사용가능한 물을 첨가합니다(총 4개). 이는 8채널 피펫을 250 μ L로 설정하고, 한 번에 2개의 섹션에 피펫팅을 하여 수행할 수 있습니다. 그림 2에 나온 바와 같이 컬럼 1~12의 moat well에 평행으로 배분하여 모든 4개 섹션을 채웁니다.

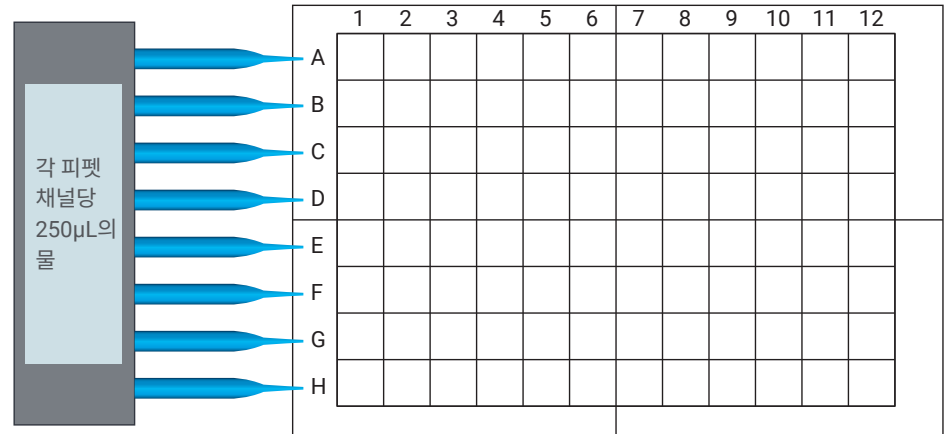


그림 2. 8채널 피펫을 이용한 moat well 채우기.

5. **중요 사항:** 플레이트를 조직 배양 후드 내에서 실온 조건 하에 1시간 동안 안정되도록 둡니다.
6. 1시간이 지난 후, 세포가 담긴 플레이트를 적절한 습도의 37°C CO₂ 인큐베이터로 이동시킵니다. 이동 과정에서 moat well로부터 물이 넘치는 것을 방지하려면 플레이트를 기울이거나 흔들어서는 안 됩니다.
7. 세포가 조직 배양 인큐베이터에서 밤새 자라도록 합니다. 세포의 성장 및 건강 상태를 현미경으로 모니터링합니다.

자세한 절차

시딩 양 선택

최적의 세포 시딩 양 수치는 세포 유형에 따라 크게 달라지지만, 일반적으로는 0.5~4.0 $\times 10^4$ cells/well이며 경험에 따라 결정되어야 합니다.

예를 들면: 1개의 XF Pro M 마이크로플레이트를 2.0 $\times 10^4$ cells/well의 양으로 시딩하면, 4.20 $\times 10^6$ cells/mL의 원액을 얻습니다. 1개의 플레이트가 필요하므로, 아래의 세포양에서 10mL로 희석된 세포 부유액의 총 용량은 2.5 $\times 10^5$ cells/mL여야 합니다 (예: 2.0 $\times 10^4$ cells/well \div 0.08mL/well = 2.5 $\times 10^5$ cells/well).

공식 1 사용: (4.20 $\times 10^6$ cells) \times (XmL) = (2.5 $\times 10^5$ cells) \times (10mL)

X 값이 0.595mL로 계산됩니다. 따라서 원액 세포 부유액 0.595mL를 9.405mL의 적절한 세포 배양 배지에 첨가하여 10mL의 2.5 $\times 10^5$ cells/mL를 얻고, 이는 80 μ L의 세포 배양 배지에서 2.0 $\times 10^4$ cells/well의 최종 세포 양이 됩니다.

최적의 세포 양에 대한 더 자세한 정보는 다음을 참고해 주세요. [관련 자료와 표준물질](#)을 포함한 Agilent Seahorse XF Assay 학습 센터: 세포 참조 데이터베이스.

세포 수확 및 재부유

1. 세포 시딩 시에 일관된 세포 단일층을 생성하려면 단일 세포 부유액이 최적입니다. 뭉쳐진 세포는 시딩 전에 떼어놓는 것이 좋습니다. 또한 세포를 카운팅하고 XF Pro M 세포 배양용 마이크로플레이트에 시딩하기 전에 세포를 완전히 재부유하는 것도 중요합니다. 세포 배양 및 XF 세포 배양 마이크로플레이트 시딩의 가장 좋은 방법에 대한 더 자세한 정보는 [관심 세포 알아보기: 성공적인 XF 수행을 위한 조언 및 제안\(PDF\)](#) 을 참고해 주세요.

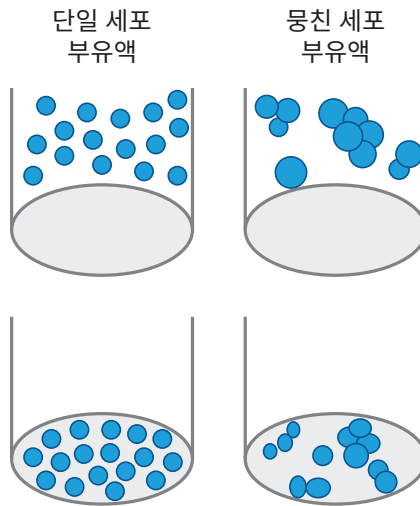


그림 3. 단일 세포 vs 뭉친 세포 부유액, well 내 세포의 분포 결과.

표 1. Agilent Seahorse XF Pro M 마이크로플레이트 세포 시딩 희석 표.

Well당 원하는 세포 밀도(세포 개수/80μL의 배지)	원액 세포 부유액(mL) (1×10 ⁶ Cells/mL)	Growth 배지 (mL)	1개의 XF Pro M 마이크로플레이트에 대한 최저 주입량(mL)
0.5 × 10 ⁴	0.5	7.5	8.0
1.0 × 10 ⁴	1.0	7.0	8.0
1.5 × 10 ⁴	1.5	6.5	8.0
2.0 × 10 ⁴	2.0	6.0	8.0
2.5 × 10 ⁴	2.5	5.5	8.0
3.0 × 10 ⁴	3.0	5.0	8.0
4.0 × 10 ⁴	4.0	4.0	8.0

- 원하는 시딩 양을 만들기 위해 세포를 희석할 때는 피펫으로 전체 용액을 2~3회 혼합해야 부유액의 균질성을 확보할 수 있습니다.

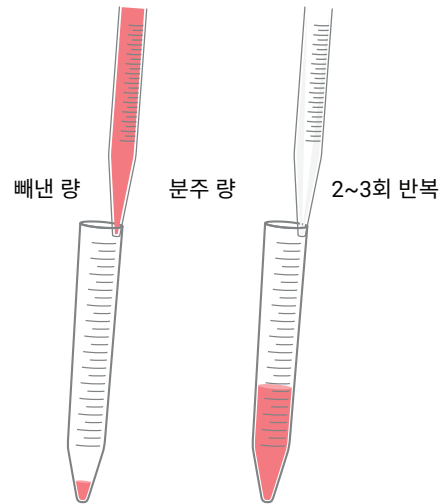


그림 4. 희석한 후 세포를 가볍게 혼합합니다.

- 희석 및 혼합된 세포를 피펫팅 저장 용기로 옮깁니다.
- 세포는 혼합 후 저장 용기에서 점차 가라앉기 시작할 수 있으며, 이는 특히 큰 세포 유형일 때 더 그렇습니다. 따라서 시딩 과정에서는 저장 용기에 남은 세포를 가볍게 혼합하는 것이 좋습니다. 보통 하나의 플레이트에 시딩하는 동안 피펫으로 1~2회 추가적으로 혼합해 주는 정도면 충분합니다. 만약 동일한 세포 부유액을 사용해 여러 개의 플레이트에 시딩 한다면, 세포 부유액은 각 플레이트에 시딩하는 사이에도 재혼합되어야 합니다.

세포를 XF 세포 배양 마이크로플레이트로 분주하기

- XF Pro M 세포 배양용 마이크로플레이트에 세포를 분주할 때는 편의성, 속도, well과 플레이트간 일관성 유지를 위해 8~12채널 20~200 μ L의 멀티피펫 사용을 권장합니다.
- 피펫 팁은 측면 벽의 절반 정도 깊이에서 대략 45°여야 하며, well 벽에 닿아야 합니다 (그림 5). 피펫은 모든 well에서 동일한 각도로 유지되어야 합니다.
 - 팁은 세포를 분주한 후 배지에 살짝 담근 정도가 되어야 합니다.
 - 전자 피펫을 사용하면 분주량의 일관성을 향상시킬 수 있습니다.

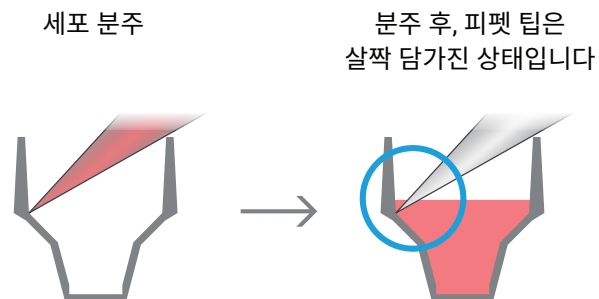


그림 5. Agilent Seahorse XF 조직 배양 마이크로플레이트로 세포를 분주할 때 적합한 피펫팅 기법.

세포 안정화 및 인큐베이션

1. 시딩 후 세포가 세포 배양 후드 내에서 실온 조건 하에 1시간 동안 안정되도록 둡니다. 이 과정을 위해 필요한 경우, 세포 플레이트를 생물안전 캐비닛 뒤쪽 부분으로 조심스럽게 옮길 수 있습니다. 온도의 급격한 변화는 세포 시딩에 즉시 영향을 미치며, XF Pro M 세포 배양용 마이크로플레이트 내에서 현저한 가장자리 성장 효과를 야기할 수 있습니다.
2. 세포를 조직 배양 인큐베이터에 넣습니다.
 - A. 인큐베이터는 적절한 습도를 갖추고 있어야 well에서 과도한 증발이 일어나지 않습니다. 조직 배양 인큐베이터 속 물받이가 권장 부피를 유지하는지 확인합니다.
 - B. XF Pro 세포 배양 마이크로플레이트를 인큐베이터의 후면을 향하도록 두어, 인큐베이터를 열고 닫을 때 일어나는 온도 및 습도 변화에 대한 노출을 최소화합니다.
 - C. 가능하다면, 해당 인큐베이터는 오직 분석 플레이트용으로만 사용하는 것이 인큐베이터 문을 자주 열고 닫음으로써 발생할 수 있는 영향을 줄일 수 있습니다.

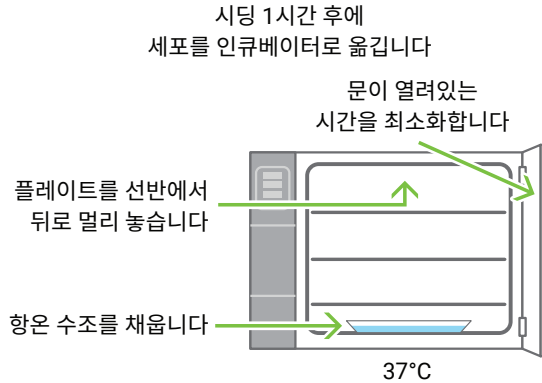


그림 6. 세포를 적절한 습도의 인큐베이터로 옮깁니다.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

RA44524.2607175926

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 12월 14일, 한국에서 인쇄
5994-4356KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

 **Agilent**
Trusted Answers