

ECAR and OCR measurements (XF24e)

20150915 Daun
20190521 Daun

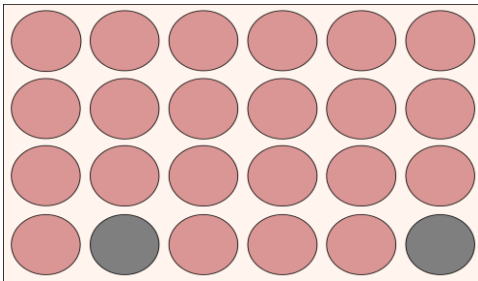
➤ Materials

- CO₂ incubator (37°C)
- Non- CO₂ incubator (37°C) - 321호 마크로파지랩 오븐 사용 (37°C로 맞춰서 사용)
- XF analyzer (37°C) - 기기 사용 최소 4시간 전에 기기를 켜두고 software 켜놓아 예열을 미리 해준다.
- XF cell culture plate, Utility plate (Seahorse bioscience)- 102340-100 (18 assay)
- XF Cell Mito Stress Test Kit (Cat No. 103015-100, Oligomycin, FCCP, Rotenon/antimycin 포함)
- XF glycolysis Stress Test Kit (Cat No. 103020-100, glucose, Oligomycin, 2-DG 포함)
- Drug Compound: D-glucose (sigma,G7021), Oligomycin (Santacruz,sc-203342), 2-DG(sigma,D6134), FCCP (Cayman, 15218),
- XF Base Medium DMEM (Seahorse bioscience, 102353-100)
- XF calibrant (Seahorse bioscience)
- L-glutamine(gibco, 11430-030), pyruvate(sigma)

➤ Process

Step 1: cell preparation

- 클린벤치에서 파란색 패키지를 열어 “cell culture microplate” 를 꺼낸다
- 각각의 well 에 실험하고자 하는 cell을 seeding 한다-한 그룹당 최소 4개 이상으로 seeding (ex)MM 세포의 경우 500µl volume으로 2×10^5 cells/ well)
- random 으로 2개~4개 정도 blank를 지정하고 blank를 빼고 seeding 한다.



- 실험 당일 날까지 CO₂ incubator 에서 incubation (BMDM 의 경우 중간중간 배지 갈아줄 때마다 mono-layer로 잘 깔려 있는지 확인하면서 갈아준다.)

Step 2 : material preparation

- Media 만들기.
 - W/O glucose media (washing media):
 - XF Base Medium 를 37°C까지 예열한 뒤 pH7.4로 맞춰준다
 - Mito stress test media
 - 25mM glucose, 1mM pyruvate, 1mM Glutamine in 50ml XF Base medium (0.227g D-glucose, 100mM pyruvate 500ul, 100mM L-glutamine 500ul in 50ml media)
 - 37°C까지 예열하여 pH7.4로 맞춰준다
 - Glycolysis capacity test media:
 - 0mM glucose, 1mM Glutamine in 50ml XF Base medium
 - 37°C까지 예열하여 pH7.4로 맞춰준다

- 만들어둔 media는 37°C 유지하기 위하여 미리 water bath에 넣어둔다.

● **Utility Plate (초록색) 준비**

- 클린벤치에서 초록색 패키지를 뜯어“Sensor Cartridge+ utility plate” 를 꺼낸다
- Utility plate에 1ml/well D.W 넣고 Sensor cartridge를 다시 덮어 non-co2 incubator에서 overnight
- 25ml xf calibrant (pH7.4)를 tube 에 넣어 Non- CO₂ incubator (37°C)에서 같이 overnight
 - 뚜껑의 sensor가 바닥에 닿지 않도록 조심한다
- **XF-analyzer 기기 예열**
 - 실험 하루 전 또는 사용 최소 4시간 전에 전원을 켜놓고 XF software (Wave) 를 실행시켜 기기에열을 시작한다 (다음날 오전에 사용할 경우 하루 전 날 밤에 기기를 켜두고 오후에 사용할 경우 당일 아침에 기기를 켜둔다).

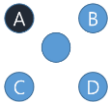
Step 3 : D-Day, xf-analysis

● **Utility Plate (초록색) 준비**

- 기기예약 1시간 30분 전에 utility plate 의 D.W 를 제거해주고 Calibrant 를 1ml 씩 24 well 에 넣어준 뒤 plate 를 다시 non-CO₂ incubator 에 넣어준다.
- **Cell Washing**
 - CO₂ incubator 에서 cell culture microplate를 꺼내서 준비된 washing media 525 µL 로 조심스럽게 두 번 rinsing한 후 running media로 525µL/well 채워준다.
 - 30분-1시간 동안 Non- CO₂ incubator (37°C)에 넣어둔다.

● **Drug treatment:**

- non-CO₂ Incubator 에서 utility plate 꺼내서 사용하는 port에 drug (75 µl) 을 넣어준다 (사용하지 않는 나머지 port, blank 에는 모두 running media 75µl 를 넣어준다)



❖ Drug final 농도
 - A port 사용 (8X)
 - B port 사용 (9X)
 - C port 사용 (10X)
 - D port 사용 (11X)

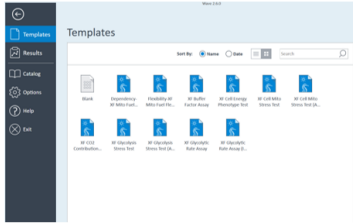
- drug 계산 예시

glycolytic capacity	stock	conc	cycle	PORT	port cont			stock 희석배수	필요 well	필요량	media	시약	
glucose	2.5 M	10 mM	4	A	8x	80	mM	31.25	22	1650	1800	57.6	
oligomycin	5 mM	10 uM	4	B	9x	90	uM	55.56	22	1650	1800	32.4	
2DG	1 M	50 mM	4	C	10x	500	mM		2	22	1650	1800	900
respiratory capacity	stock	conc	cycle	PORT	port cont						media	시약	
oligomycin	5 mM	10 uM	4	A	8x	80	mM	62.5	22	1650	1800	28.8	
FCCP	2.5 mM	1 uM	4	B	9x	9	uM	277.78	22	1650	1800	6.48	
R+A	2.5 mM	1 uM	4	C	10x	10	mM	250	22	1650	1800	7.2	

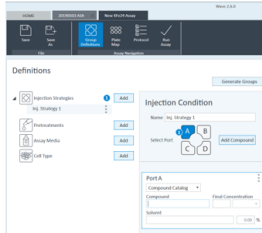
- utility plate 를 챙겨서 기계가 있는 곳 까지 간 뒤 기기 setting 한다

✓ 기기 setting (wave): _

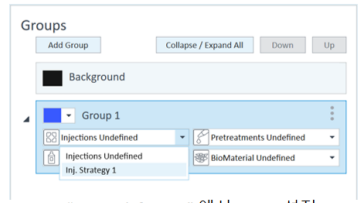
-바탕화면의 wave 를 클릭하여 프로그램을 연 뒤 blank 를 클릭하고 Template 부터 설정한다.



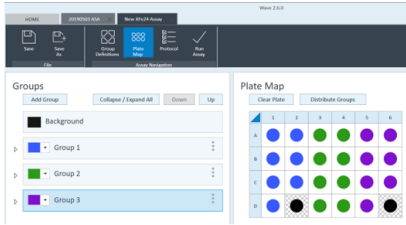
1. Blank 클릭



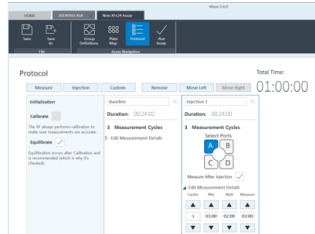
2. "Group definition" 에서 "Injection strategies" 설정 사용할 포트에 주입할 약물 이름을 기재한다.



3. "Group definition" 에서 Group 설정 group 이름과 injection strategy 를 설정한다



4. "Plate map" 으로 넘어가서 well 설정



5. "Protocol" 로 넘어가서 protocol 지정 "injection" "놀러서 포트 설정하고 cycle 지정



6. "Run assay" 로 넘어가서 "start run" 누른 뒤 utility plate 넣어준다 (이 때 기기들의 모양에 맞게 왼쪽 아래의 사선모양에 맞추어 plate 를 넣어준다

7. 화면의 "I'm ready" 를 클릭하면 20분 정도 calibration 진행 된다

8. 20분 후 calibrate plate 를 빼주고 cell culture plate 를 넣어준다