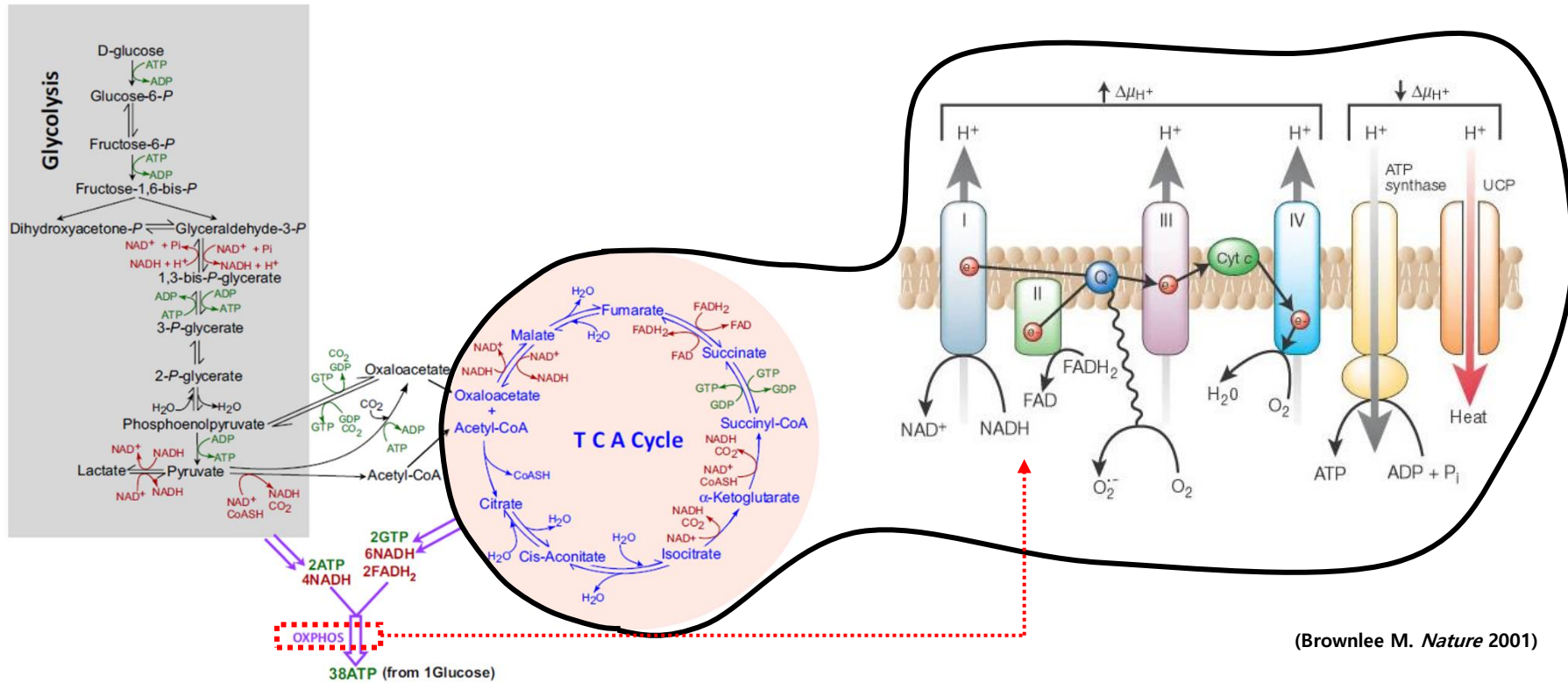


Cellular Real-Time ATP Rate의 이해 및 실험방법 (Seahorse XFe96, Agilent)

세포 내 adenosine triphosphate (ATP) rate는 cellular metabolism의 상태를 나타내는 주요한 척도이며, 총체적인 에너지 상태를 나타내는 지표로 활용되고 있습니다. 세포는 intracellular ATP level을 유지하기 위한 방편으로 metabolic regulation을 통한 ATP 생산을 조절함으로써 ATP요구도와 관련하여 변화된 환경에 적응해 나가고 있습니다. 살아있는 세포에서, total ATP production은 mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS)와 glycolysis를 통해 이루어지고 있습니다.



(Brownlee M. Nature 2001)

(Alam et al. Clin Trans Med. 2016; DOI 10.1186/s40169-016-0082-9)

앞서 말씀드렸다시피, mammalian cells에서 cellular ATP의 생성은 glycolysis와 OXPHOS pathway에 의해서 이루어집니다. 미토콘드리아에서 일어나는 OXPHOS과정 중 O_2 가 소비되며, 이는 oxygen consumption rate (OCR)의 형태로 측정이 가능합니다. 반면, extracellular acidification rate (ECAR)는 culture media의 산성화(acidification) 정도에 따라 다르게 나타나며, 이는 glycolysis 단계에서 발생하는 lactate + H^+ 의 양과 미토콘드리아의 TCA cycle로부터 발생하는 $CO_2+H_2O \rightarrow HCO_3+H^+$ 의 양에 따라 좌우됩니다. 세포 바깥으로 배출되는 hydron; H^+ efflux (ECAR)과 세포에서 소비되는 O_2 consumption (OCR)을 각각 basal level, oligomycin treatment, rotenone/antimycin A treatment 단계별로 측정하게 되면, total cellular ATP production rates와 pathway-specific mitoATP, glycoATP production rates를 아래의 공식을 이용하여 구해낼 수 있게 됩니다.

Glycolytic ATP production rate calculation:



$$\text{glycoATP Production Rate (pmol ATP/min)} = \text{glycoPER}^* \text{ (pmol H}^+/\text{min)}$$

Mitochondrial ATP production rate calculation:

$$\text{OCR}_{\text{ATP}} \text{ (pmol O}_2/\text{min)} = \text{OCR (pmol O}_2/\text{min)} - \text{OCR}_{\text{oligomycin}}^{**} \text{ (pmol O}_2/\text{min)}$$

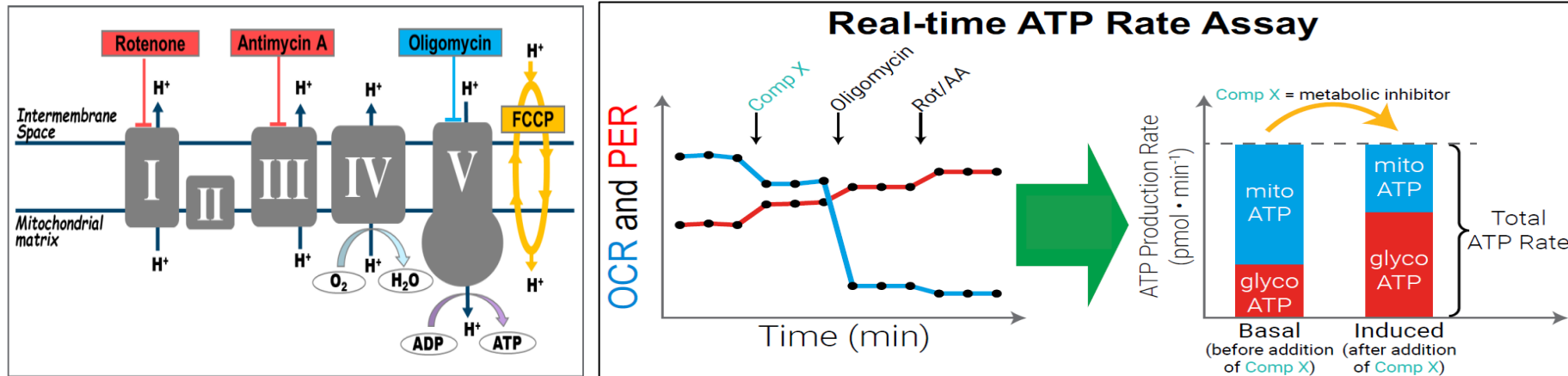
$$\text{mitoATP Production rate (pmol ATP/min)} = \text{OCR}_{\text{ATP}} \text{ (pmol O}_2/\text{min)} \times 2 \text{ (pmol O/pmol O}_2\text{)} \times \text{P/O}^{***} \text{ (pmol ATP/pmol O)}$$

$$\text{ATP Production rate (pmol ATP/min)} = \text{glycoATP production rate (pmol ATP/min)} + \text{mitoATP production rate (pmol ATP/min)}$$

* PER: Proton Efflux Rate

** Oligomycin: ATP synthase inhibitor

*** P/O ratio: the ratio of phosphate incorporated into ATP to oxygen atoms; P/O value for NADH oxidation is 2.75



실험 준비 및 전처리:

1. 전용 assay Media: 100 mL of Seahorse XF DMEM (pH 7.4) + 10 mM of glucose + 1 mM of Pyruvate + 2 mM of glutamine at 37°C
2. Preparation of Seahorse XF cell culture microplate:
 - a. Remove the cell culture medium and rinse cells twice with the assay medium prepared above.
 - b. Incubate cell culture microplate with assay medium at 37°C in a non-CO₂ incubator for 40-60 minutes.
3. Preparation of stock compounds: refer to 세포체학실험실 자료실(Cellomics online archive) "XFe96 Assay Kit Dilution Method".
4. Normalization: Hoechst based nuclei counting method or protein level quantification could be recommended.

Seahorse XFe96 실험관련 문의: 세포체학실험실(ext. 1714 / e mail: 21117@snuh.org)