

Background Correction of OCR (pmol/min) Readout (Seahorse XFe96, Agilent)

Mitochondria stress analysis 이후, 보여지는 OCR (pmol/min) graph가 과도한 standard deviation (SD)으로 인하여서 적정 수치 안에 들어오지 않을 경우, 추가적인 교정(correction) 작업을 통해 일정부분 보정할 수 있습니다. 따라서, Seahorse XFe96장비를 사용할 경우, 96-well plate의 강점인 실험군의 "N"수를 늘려 (최소 1개 column에 1개 실험군을 지정할 경우, 최소 14개 그룹간 비교 가능) 예기치 못한 events로 발생된 outliers (wells)를 최종 data에서 제거함으로써 보정된 OCR graph를 얻을 수 있습니다. 보통의 경우, cells이 seeding되지 않은 background correction wells (A1, A12, H1, H12)에서는 O₂ consumption rate (pmol/min)가 낮기 때문에 sensor cartridge의 detection probe에 감지되는 O₂ level은 150-160 mmHg로 높게 형성되어 있습니다. 반면, cells 또는 extraction된 mitochondria가 존재하는 wells에서는 지속적으로 O₂ consumption이 일어나므로 detection probe에서 reading되는 O₂ level은 150 mmHg 이하로 보여지게 됩니다. 따라서, 각 well별 O₂ (mmHg) readout data에서 background correction wells의 O₂ (mmHg) readout값 보다 높게 나타나는 wells을 최종 data에서 한 개씩 제거함으로써 OCR graph를 보정해 나갑니다. 간혹 background correction wells (A1, A12, H1, H12)에서 O₂ (mmHg) readout값이 150 mmHg보다 낮게 나오거나 baseline에서는 160-170 mmHg를 찍다가 oligomycin 또는 FCCP treatment 이후에 150 mmHg 이하로 떨어지는 경우 (possibly sensor cartridge detection probe error caused by decaying or unusual events), 해당하는 background correction well을 raw data에서 삭제함으로써 문제를 해결할 수 있습니다.

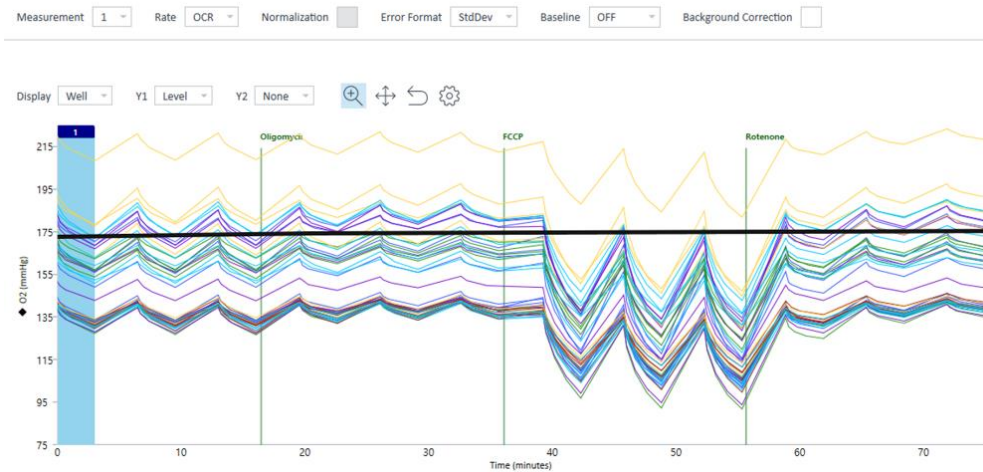


Plate Map

OCR (pmol/min)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7.86	86.06	93.19	103.98	69.90	93.19	119.73	109.07	250.81	192.56	38.01	0.00
B	90.29	101.95	92.52	100.45	87.95	71.71	244.81	1.06	197.94	22.09	33.61	52.18
C	73.50	88.52	93.84	114.20	77.48	70.66	35.52	-27.54	-10.87	0.12	67.60	34.21
D	80.20	82.17	68.86	103.81	80.35	67.82	32.47	89.80	40.20	119.38	104.62	18.42
E	28.07	83.40	55.03	80.77	88.10	92.83	46.19	279.92	238.00	235.72	-15.82	12.93
F	96.12	109.80	102.69	100.58	87.82	98.35	33.32	31.32	31.98	218.79	34.97	37.90
G	71.65	87.71	69.85	104.33	101.90	105.82	34.56	261.72	42.26	385.79	-33.18	25.75
H	15.50	96.06	86.21	81.09	66.43	103.58	33.37	33.21	-25.96	11.34	-6.89	25.42

Figure 1. Overview of O₂ (mmHg) consumption level and a plate map image with individual OCR (pmol/min) result.

보정방법:

1. Wave software의 data result화면에서 + "Add"를 클릭하여 Overview화면을 open한다.
2. Normalization을 uncheck한 뒤, Background Correction 또한 uncheck하여 준다.
3. Display mode를 Group에서 Well로 변경하여 준다.
4. Readout값 Y1의 Rate를 Level로 변경하여 준다.
5. 화면에 검정색 line으로 보여지는 background correction lines (A1, A12, H1, H12)를 기준으로 그 보다 위 쪽으로 배열된 well data를 우측 plate map에서 클릭하여 삭제하여 준다.

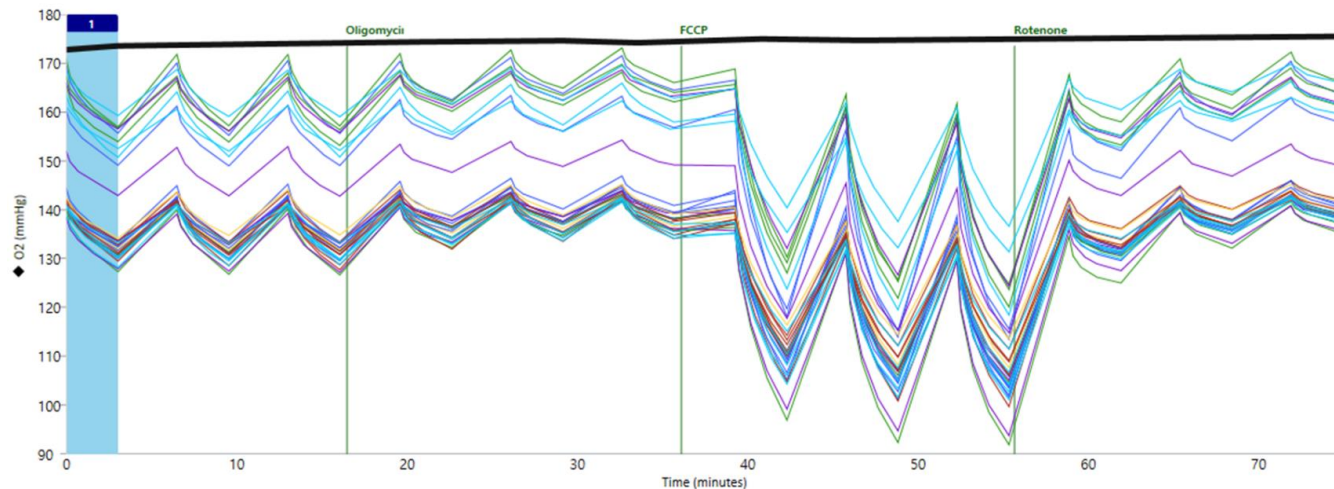


Figure 2. O₂ (mmHg) level at each detection point (3 points/15 min) measured by sensor cartridge detection probes and background correction line

shown in thick black.

6. Background correction line이 linear하지 않은 형태를 보이면 해당 background correction well data 역시 우측 plate map에서 클릭하여 삭제하여 준다.
7. 완료되었으면, Y1값을 다시 Rate로, Display mode를 다시 Group으로 변경하여 준 다음, 화면 상단의 Background Correction을 check하여 준다.

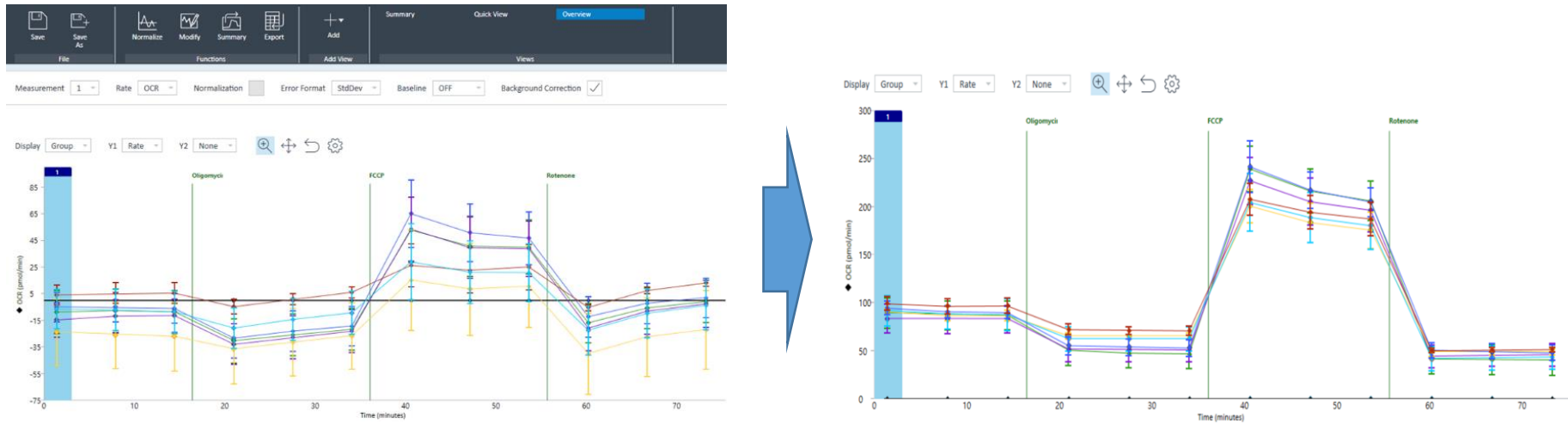


Figure 3. Before and after background and outlier correction

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