

**CytoSelect™ 48-well Cell Adhesion Assay**  
**Fibronectin Coated**  
**(Fluorometric Format)**

**Cat. No. CBA-051**

研究目的のみのご使用になります  
(診断目的にはご使用いただけません)

## はじめに

細胞接着は胚形成、遊走/浸潤、組織修復および創傷治癒に関連した複雑な過程です。これらの過程を実行するために、細胞は細胞外マトリックス成分に結合し(接着レセプターを介して)、最終的に細胞の運動性、分化、増殖や生存に影響を与える細胞骨格成分と複合体を形成します。Cell Biolab 社の CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit は細胞接着を評価するための迅速で定量的な方法をご提供します。このキットには 48 サンプル(フィブロネクチンコート済みウェルが 40 個と BSA コート済みウェルが 8 個)の評価に十分な試薬を含んでいます。

Cell Biolab 社の CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit は研究使用のみを対象としており、診断や治療目的には使用できません。

## アッセイ原理

CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit はフィブロネクチンコート済み 48-well プレート(Adhesion Plate Layout 参照)を利用しています。まず細胞をコートした基質の上に播き、接着細胞を接着させます。次に、非接着性細胞を洗浄除去し、接着細胞を溶解して CyQuant® GR Dye で検出します。

## キットの構成内容

1. Fibronectin Adhesion Plate (Part No. 105001): フィブロネクチンコート済み well 40 個と BSA コート済み well 8 個の 48-well プレートが 1 枚
2. 4X Lysis Buffer (Part No. 10404): -10.0mL が 1 本
3. CyQuant® GR Dye (Part No. 105101): -50  $\mu$ L が 1 本

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin
B	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin
C	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin
D	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin
E	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin
F	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA

## キットには含まれていないが必要な試薬・機器

1. 細胞培養培地
2. 無血清培地 (例えば、0.5% BSA・2mM CaCl<sub>2</sub>・2mM MgCl<sub>2</sub> を含む DMEM)
3. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>)
4. 2mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub> を含む 1x PBS

5. 光学顕微鏡
6. 蛍光プレートリーダー用 96-well プレート
7. 蛍光プレートリーダー

### 保存

全構成品は使用期限まで 4°C で保存してください

### アッセイ プロトコール

1. 滅菌条件下で Fibronectin Adhesion Plate を 10 分間室温に置いておく。
2. 無血清培地に  $0.1 \sim 1.0 \times 10^6$  cells/ml を含む細胞懸濁液を準備する。細胞接着を阻害もしくは刺激する薬剤を細胞懸濁液に直接加える。
3. 150  $\mu$ l の細胞懸濁液を well に加える (BSA コートの well はネガティブコントロールです)。
4. インキュベーター内で 30~90 分間インキュベーションする。
5. 注意しながらそれぞれの well から培地を吸引除去あるいは排泄する (注意: well を乾燥させないこと)。各 well を 250  $\mu$  L の PBS で 4-5 回穏やかに洗浄する。
6. 十分量の 1X Lysis Buffer/CyQuant® GR Dye (300:1) を調製する (例えば、5  $\mu$  L の dye を 1495  $\mu$  L の 1X Lysis Buffer と混合)。
7. 200  $\mu$  L の 1X Lysis Buffer/CyQuant® GR Dye 溶液を細胞を含むそれぞれの well に加える。室温で 20 分間振盪させながらインキュベーションする。
8. 蛍光測定用の 96-well プレートに各サンプル 150  $\mu$  L を移す。480nm/520nm における蛍光を蛍光プレートリーダーで測定する。

### 参考実験結果

下記の図は CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit を使用した一例です。蛍光測定に 485/520nm フィルターをセットした 530nm カットオフの SpectraMax Gemini XS Fluorometer (Molecular Device 社) を使用しました。参照程度に下記データをご使用下さい。このデータを実際の結果として説明することはおやめ下さい。

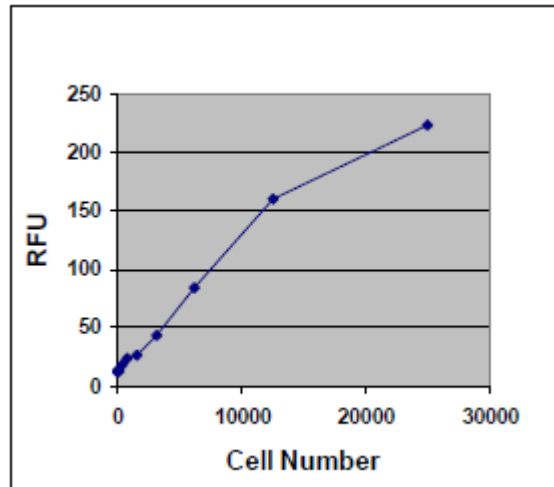


図 1: ヒト HT-1080 の定量

HT-1080 細胞を 1X PBS で処理後溶解し、2X Lysis Buffer/CyQuant® Dye (75  $\mu$  L の細胞懸濁液を 75  $\mu$  L の 2X Lysis Buffer/dye と混合) で検出した。

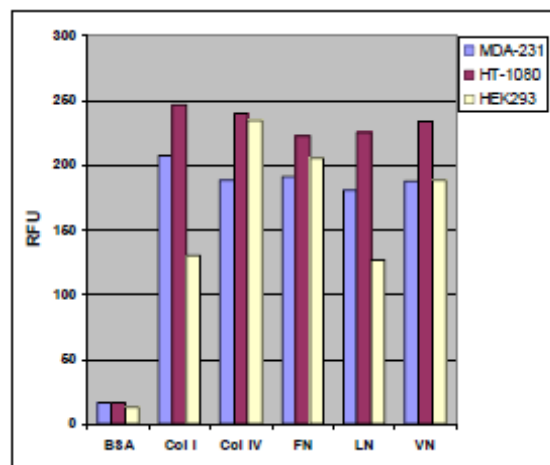


図 2: ECM 介在性細胞接着

血清飢餓細胞を 100,000cells/well 使用し、1 時間 ECM コート済 48-well プレートに接着させた。プロトコルに従い接着細胞を溶解し、CyQuant® GR Dye で定量した。

**参考文献:**

1. Hynes, R.O. (1992) Cell 69, 11-25.
2. Schwartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg, M.H. (1995) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11, 549-599.