

# **CytoSelect™ 24-well Cell Migration Assay**

## **(8 $\mu$ m, Fluorometric Format)**

**Cat. No. CBA101**

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

細胞遊走は免疫応答や受精後の胚形態形成、組織修復および再生などの様々な段階に関与しています。また、癌や精神遅滞、アテローム動脈硬化症、関節炎などの疾患の進行においても極めて重要な役割を果たしています。遊走促進物質への細胞の初期応答には、誘因物質へ極性を持つこと、また突出することが挙げられます。これらの突出は広大な葉状仮足あるいはスパイク状の糸状仮足からなります。いずれの場合でも、これらの突出はアクチン重合によって促進され、細胞外基質 (ECM) 接着もしくは細胞-細胞間の相互作用によって安定化されます。

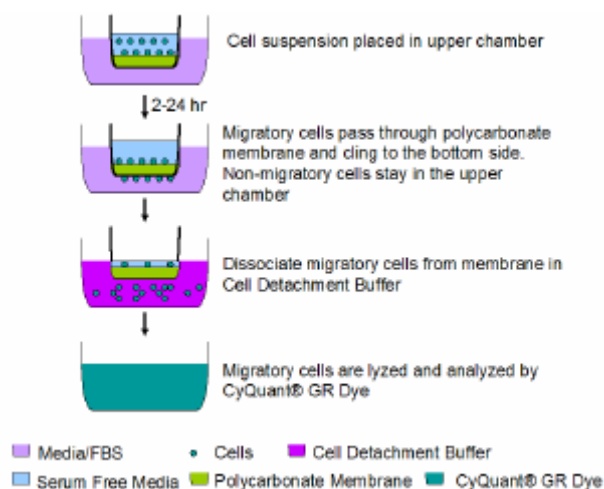
Cell Biolabs社の CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit では細胞の遊走特性をアッセイするためにポリカーボネート膜インサート (8  $\mu$  mポアサイズ) を利用しています。本キットではCalcein AM で細胞を予め標識したり非遊走細胞をとりのぞいたり (コットンでの拭き取り) する必要はありません。すべての遊走細胞を膜から剥離、溶解し、CyQuant® GR Dye で検出します。

Cell Biolabs社の CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit は細胞遊走の定量に適したシステムです。本キットは 12 サンプル分に十分な量の試薬が含まれています。8  $\mu$  m ポアサイズは上皮や線維芽細胞の遊走に適しています。白血球の走化性の場合は小さいポアサイズ (3  $\mu$  m) をお勧めします。

Cell Biolabs社の CytoSelect™ Cell Migration 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

Cell Biolabs社の CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit は 24-wellプレートにポリカーボネート膜インサート(8  $\mu$  mポアサイズ) が付属しています。その膜は遊走細胞と非遊走細胞を分け隔てる役割をします。遊走細胞は化学遊走物質の方へ突出し(アクチン細胞骨格再構成を経て)、最終的にはポリカーボネート膜の穴を通り抜けます。その後遊走細胞を膜から分離し、続いてCyQuant® GR Dye で検出します。



### キットの構成内容

1. 24-well Cell Migration Plate (Part No. 10301): 12 細胞培養用インサート (8  $\mu$ m ポアサイズ) が付属した 24-well プレートが 1 枚
2. Cell Detachment Solution (Part No. 10101): ボトル 1 本 - 5.0mL
3. 4X Lysis Buffer (Part No. 10102): ボトル 1 本 - 5.0mL
4. CyQuant<sup>®</sup>GR Dye (Part No. 10103): チューブ 1 本 - 25  $\mu$ L
5. Forceps (Part No. 11005): 1 本

### キットには含まれていない他に必要な試薬・機器

1. 遊走細胞株
2. 細胞培養培地
3. 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)
4. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>)
5. 光学顕微鏡
6. 蛍光プレートリーダーに適した 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. 24-well Migration Plate を 10 分間室温においておく。
2. 無血清培地に 0.5~1.0 x 10<sup>6</sup> cells/ml を含む細胞懸濁液を準備する細胞遊走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. migration plate の lower well に希望の化学誘因物質もしくは 10% FBS を含む培地を 500  $\mu$ l 加える。
4. インサートに細胞懸濁液を 300  $\mu$ l を加える。
5. プレートをカバーし、2~24 時間インキュベーションする。
6. 注意してインサートから培地を吸引除去する。そしてそれを事前に用意した 225  $\mu$ l の Cell Detachment Solution が入った well に移す。
7. インサートを何回か優しく傾け、膜の底面から細胞を完全に剥離させる。
8. CyQuant<sup>®</sup>GR を 4X Lysis Buffer で 1:75 に希釈し (例えば 5  $\mu$ l の CyQuant<sup>®</sup>GR dye に 370  $\mu$ l の 4X Lysis Buffer を加える)、十分量の 4X Lysis Buffer / CyQuant<sup>®</sup>GR dye solution を準備する。
9. 遊走細胞が入っている 24-well プレートの各 well に 75  $\mu$ L の 4X Lysis Buffer /

CyQuant® GR dye solution を加える。20 分間、室温においておく。

10. 蛍光測定に適した 96-well プレートに 200  $\mu$ l の混合液を移す。蛍光プレートリーダー (480nm/520nm) で蛍光を読む。

## 実験結果

下記の図はCytoSelect™ Cell Migration Assay Kitを使用した典型的な結果です。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。

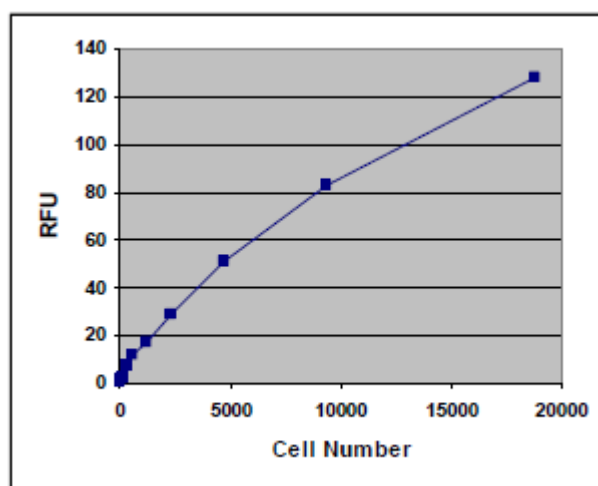


図 1: ヒト HT-1080 細胞の定量

HT-1080 細胞をCell Detachment Bufferで処理後溶解し、4X Lysis Buffer / CyQuant® GR Dye (150  $\mu$ lの細胞懸濁液を 50  $\mu$ lの 4X Lysis Buffer/dye で混合) で検出した。

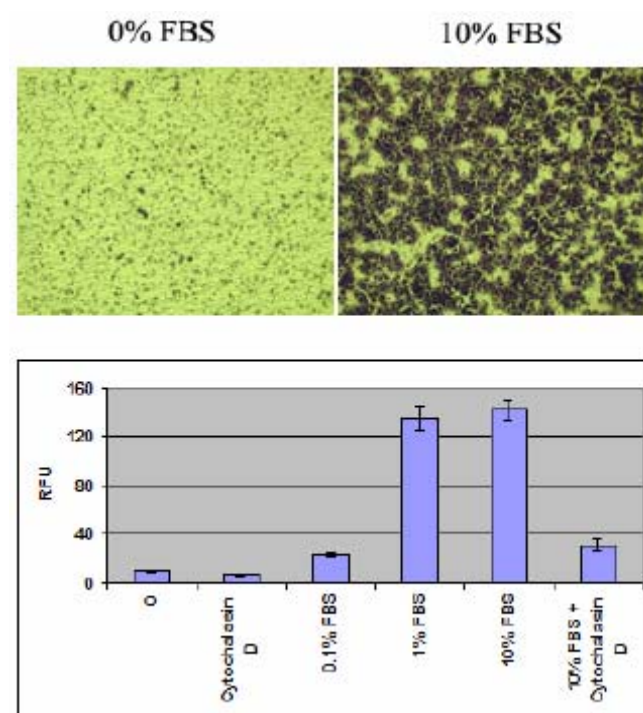


図 2: ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞の走化性

HT-1080 細胞とNIH3T (ネガティブコントロール) を 30,000cells/wellで播き、4 時間培養してFBSに関する遊走性を  $2 \mu\text{M}$  Cytochalasin D 存在下もしくは非存在下でテストした。ポリカーボネート膜の底面の遊走細胞を染色し(上図)、プロトコールに従いCyQuant® GR Dyeで定量した。

#### 参考文献:

1. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003) Science 302, 1704-9.
2. Horwitz R, Webb D. (2003) Curr Biol. 13, R756-9.
3. Lauffenburger DA, Horwitz AF. (1996) Cell 84, 359-369.